



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
CURSO DE MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS

**Estudo Experimental sobre a Resposta Imunológica em infecções sequenciais pelo Vírus
Dengue 3 e pelo Vírus Dengue 2 em Primatas não Humanos da Espécie *Callithrix
penicillata*.**

MILENE SILVEIRA FERREIRA

Belém-Pará

2012

MILENE SILVEIRA FERREIRA

Estudo Experimental sobre a Resposta Imunológica em infecções sequenciais pelo Vírus Dengue 3 e pelo Vírus Dengue 2 em Primatas não Humanos da Espécie *Callithrix penicillata*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau em Mestre em Doenças tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos.

Belém-Pará

2012

MILENE SILVEIRA FERREIRA

Estudo Experimental sobre a Resposta Imunológica em infecções sequenciais pelo Vírus Dengue 3 e pelo Vírus Dengue 2 em Primatas não Humanos da Espécie *Callithrix penicillata*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará. Comissão formada pelos professores:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos –Instituto Evandro Chagas- Orientador.

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho, Centro de Pesquisa René Rachou- FIOCRUZ-MG
- Avaliador.

Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb, Universidade Federal Rural da Amazônia- Avaliador.

Profa. Dra. Sueli Guerreiro Rodrigues, Instituto Evandro Chagas- Avaliadora.

Profa. Dra. Lívia Caricio Martins, Instituto Evandro Chagas- Suplente.

Aprovado em: ___/ ___/ ___

Conceito: _____

i

DEDICATÓRIA

Aos meus pais com amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus por me manter perseverante na busca do conhecimento e por ter me possibilitado concretizar mais esse projeto que há tanto tempo trago dentro do meu coração.

Aos meus amados pais, Nonato e Fátima pelo amor, carinho, apoio e incentivo a minha vida acadêmica. Obrigada por todos os ensinamentos principalmente aqueles que não se aprendem na escola como a honestidade, a humildade e o amor.

À minha irmã Lorena pelo carinho, pelo companheirismo e pelas infinitas revisões ortográficas.

Às minhas tias, Maria José, Meonice e Graça, ao meu tio Atevaldo e aos meus primos Nilton e Gerson pelas orações, pelo carinho e pelos cuidados durante toda a minha vida.

As minhas famílias adotivas (Bizinotos e Simões Farias) e aos amigos, especialmente os Sudani de Castro, os Olmedo Nunes, os da Silva Portal, os Aguiar, a Remédios Sertão, a Maricélia Ferreira e a Ivanilde da Silva que sempre estão presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos pelo exemplo de humildade e humanidade e por todo o apoio, incentivo e orientação acadêmica e profissional.

À minha grande amiga e mestra, Dra. Socorro Azevedo pelo carinho, pelo incentivo e pelo tempo dedicado a minha formação acadêmica e profissional.

Aos novos colegas do Centro Nacional de Primatas, MSc. Paulo Castro, MSc. Gilmara Abreu, aos técnicos Sebastião e Alfredo e tratadores por toda alegria e ajuda no manejo dos animais e na realização dos testes hematológicos.

Aos amigos, Dra. Roseli Braga e MSc. Frederico Neves da Seção de Patologia do Instituto Evandro Chagas, pelo apoio na realização dos testes bioquímicos.

Aos amigos, Dr. Olindo Assis Martins Filho, Dr. Márcio Araújo, MSc. Amanda Silveira e Dra. Andréa Carvalho do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou pelo apoio na análise imunológica e estatística.

Aos amigos da Sorologia I, meu querido Basílio Buna, Dra. Livia Caricio, Dra. Jannifer Chiang, MSc. Daniele Henriques, Liliane Chagas e Camille Oliveira pela parceria, pelo carinho e pelo aprendizado diário.

Aos amigos da Biologia Molecular, MSc. Samir Casseb, MSc. Mayra Silva e MSc. Helena Baldez Vasconcelos pela amizade e por toda a ajuda com as técnicas de biologia molecular.

Aos colegas da Sorologia II, Dra. Sueli Rodrigues, Assis dos Prazeres e Elpídia Costa pelo apoio na realização de testes sorológicos.

Aos colegas do Laboratório de cultivo celular, António Gregório Dias Júnior, Karlyane Brum, Creusa Carvalho, MSc. Eliana Pinto, MSc. Valéria Carvalho e Ercília Gonçalves pela ajuda ímpar com os cultivos de célula.

Aos amigos da Entomologia, MSc. Joaquim Nunes Neto, MSc. Hamilton Monteiro, MSc. Francisco Castro, Hélio Saraiva e Orlando Vaz.

Aos meus adorados amigos da Secção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas, que me recebem todos os dias com muita alegria e muito carinho. Um agradecimento especial a Mari Furtado, Joanete Carvalho, Raimundo dos Prazeres, Gleiciane Brandão, Keiler Nascimento, Isaac Matos, Maria Freitas, MSc Daisy Elaine da Silva, Vera Silva, Dr. Euzébio Oliveira, MSc. Armando Pereira, Osvaldo Vaz e Jonas Moraes.

Aos meus amigos de mestrado, MSc. Paula Spada, MSc. Juliana do Amaral, MSc. Rhomero Souza, MSc. José Maria Abreu Junior, MSc. Carlos Albério, MSc. Jones Siqueira e MSc. Jairo Cunha pelos bons momentos dentro e fora de sala de aula.

Ao Instituto Evandro Chagas pelo incentivo e suporte para realização desse trabalho.

A Universidade Federal do Pará e ao Curso de Pós- Graduação em Doenças Tropicais por tornar possível a minha formação profissional.

Ao CNPq e ao INCT para Febres Hemorrágicas pelo suporte financeiro.

A todos meus sinceros agradecimentos!

EPÍGRAFE

-Se vi mais longe foi porque subi nos ombros dos gigantes ||.
Isaac Newton (1642-1727)

RESUMO

A dengue, é causada pelo *Vírus da dengue* (VDEN - *Flaviviridae, Flavivirus*) e é considerada a arbovirose mais difundida no mundo. Atualmente, não há um animal que sirva como modelo para estudos sobre a patogênese do VDEN. Para investigar a susceptibilidade da espécie *Callithrix penicillata* ao VDEN foram inoculados amostras do VDEN-3 e do VDEN-2 de isoladas de casos humanos fatais. Para tal, vinte e dois animais foram infectados com VDEN-3 ($3,23 \times 10^3$ PFU/mL) e, sessenta dias após a infecção (d.p.i.), 11 deles foram secundariamente infectados com VDEN-2 ($4,47 \times 10^4$ PFU/mL). Sangue, plasma e soro, foram coletados diariamente durante os primeiros sete dias e em 15, 20, 45 e 60 d.p.i.. Foram investigados a produção de anticorpos IgM e inibidores da hemaglutinação, assim como foram analisados parâmetros hematológicos e bioquímicos e o perfil sérico de citocinas (IL-6, TNF- γ , IL-2, IFN- α , IL-4 e IL-5). A infecção primária (VDEN-3) revelou anticorpos IgM (15-20 d.p.i.), anticorpos IH (15-60 d.p.i.), aumento dos níveis de TNF- α e IFN- γ e diminuição da IL-5. Na infecção secundária (VDEN-2), foi detectado anticorpos IgM (15-20 d.p.i.), anticorpos IH (15-60 d.p.i.) e diminuição dos níveis de IL-6, TNF- α , de IFN- γ e IL-5. Além disso, foi observado em ambas infecções leucopenia, neutropenia, linfocitopenia, monocitopenia, trombocitopenia, e aumentou da AST. O aumento dos níveis de IFN- γ e TNF- α indicaram a ativação da resposta inflamatória, com a diferenciação para a resposta celular e supressão da proliferação de citocinas características da resposta humoral. A presença de anticorpos neutralizantes pode ter ocasionado a supressão da resposta inflamatória na infecção secundária o que pode ter levado a ausência de sinais de Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome do Choque do Dengue (FHD/SCD) durante a infecção secundária (VDEN-2). Os resultados indicam que o primatas não humanos da espécie *Callithrix penicillata* demonstraram susceptibilidade à cepas de VDEN de origem humana, sugerindo que esses animais são um bom modelo para estudos da resposta imunológica da Febre do Dengue (FD), assim como para a avaliação de uma vacina tetravalente.

ABSTRACT

Dengue fever is caused by Dengue virus (DENV - Flaviviridae, Flavivirus) and is considered the most widespread arbovirus in the world. Currently, there is an animal that fits a model for studies on the pathogenesis of DENV. To investigate the susceptibility of the DENV *Callithrix penicillata* were inoculated samples DENV-3 and DENV-2 isolated from human cases of fatal. To do this, twenty-two animals were infected with DENV-3 (3.23×10^3 PFU/mL) and sixty days after infection (dai), 11 of these were secondarily infected with DENV-2 (4.47×10^4 PFU/mL). Blood, plasma and serum were collected daily during the first seven days and for 15, 20, 45, and 60 dai. We investigated the production of IgM antibodies and inhibitors of hemagglutination (HI), as setup were analyzed biochemical and hematological profile and serum cytokine levels (IL-6, TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-5). Primary infection (DENV-3) showed IgM (15-20 dai), antibodies IH (15-60 dai), increased levels of TNF- α and IFN- γ and decreased IL-5. In secondary infection (DENV-2) was detected IgM antibodies (15-20 dai), antibodies HI (15-60 dai), and decreased levels of IL-6, TNF- α , IFN- γ and IL-5. Furthermore, it was observed in both infections leukopenia, neutropenia, lymphocytopenia, monocytopenia, thrombocytopenia, and increased AST. The high levels of IFN- γ and TNF- α showed activation of the inflammatory response, as the response to cellular differentiation and suppression of proliferation of cytokine features of the humoral response. The presence of neutralizing antibodies may have caused suppression of the inflammatory response in secondary infection which may have led to the absence of signs of Dengue Hemorrhagic Fever/Dengue Shock Syndrome (DHF/DSS) during secondary infection (DENV-2). The results indicate that non-human primates *Callithrix penicillata* demonstrated susceptibility to DENV strains of human origin, suggesting that these animals are a good model for studies of the immune response of Dengue Fever (DF) and for the assessment of a tetravalent vaccine.

SUMÁRIO

| | página |
|--|--------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 24 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 26 |
| 3.1 HISTÓRICO..... | 26 |
| 3.2 MODELOS EXPERIMENTAIS..... | 27 |
| 3.3 TRATAMENTO E PROFILAXIA..... | 39 |
| 3.4 ETIOLOGIA..... | 30 |
| 3.5 REPLICAÇÃO VIRAL..... | 32 |
| 3.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS..... | 34 |
| 3.7 EPIDEMIOLOGIA..... | 37 |
| 3.8 IMUNOPATOLOGIA..... | 40 |
| 3.8.1 Imunopatologia da Febre do Dengue..... | 40 |
| 3.8.2 Imunopatologia da Febre Hemorrágica do Dengue..... | 44 |
| 3.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL..... | 47 |
| 3.9.1 Específico..... | 47 |
| 3.9.2 Inespecífico ou complementar..... | 49 |
| 3.10 PERFIL BIOLÓGICO DO PRIMATA NÃO HUMANO (<i>Callithrix penicillata</i>)... | 50 |
| 4 OBJETIVOS..... | 56 |
| 4.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 56 |
| 4.1.1Objetivos específicos..... | 56 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 57 |
| 5.1 AMOSTRAS VIRAIS..... | 57 |
| 5.2 PROPAGAÇÃO DO VDEN PARA PRODUÇÃO DO ESTOQUE VIRAL..... | 58 |

| | página |
|---|-----------|
| 5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO..... | 58 |
| 5.4 PARÂMETROS DE NORMALIDADE..... | 59 |
| 5.5 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM PRIMATAS NÃO HUMANOS..... | 59 |
| 5.5.1 Inoculação das amostras virais..... | 59 |
| 5.5.2 Coleta e armazenamento de espécimes biológicos..... | 59 |
| 5.6 ESTUDOS SOROLÓGICOS..... | 61 |
| 5.6.1 Detecção de IgM pelo teste de MAC-ELISA..... | 61 |
| 5.6.2 Detecção de anticorpos totais pelo teste de inibição da hemaglutinação (IH)... | 62 |
| 5.7 ESTUDOS HEMATOLÓGICOS..... | 63 |
| 5.8 ESTUDOS BIOQUÍMICOS..... | 63 |
| 5.9 ESTUDOS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA..... | 64 |
| 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 65 |
| 6 RESULTADOS..... | 66 |
| 6.1 ALTERAÇÕES CLÍNICAS..... | 66 |
| 6.2 ESTUDOS SOROLÓGICOS..... | 66 |
| 6.2.1 Captura de IgM pelo teste de MAC-ELISA..... | 66 |
| 6.2.2 Detecção de anticorpos totais pelo teste de inibição da hemaglutinação (IH)... | 67 |
| 6.3 ESTUDOS HEMATOLÓGICOS..... | 69 |
| 6.3.1 Eritrograma..... | 69 |
| 6.3.2 Leucograma..... | 70 |
| 6.3.3 Contagem de plaquetas e avaliação do coagulograma..... | 71 |
| 6.4 ESTUDOS BIOQUÍMICOS..... | 72 |
| 6.4.1 Avaliação da função renal..... | 72 |
| 6.4.2 Avaliação da função hepática..... | 72 |
| 6.5 ESTUDOS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA..... | 73 |

| | página |
|--|------------|
| 6.6 SÍNTESE DOS ACHADOS ENCONTRADOS NO ESTUDO EXPERIMENTAL.. | 75 |
| 7 DISCUSSÃO | 77 |
| 8 CONCLUSÃO | 83 |
| 9 REFÊRENCIAS | 84 |
| ANEXO A | 99 |
| ANEXO B | 100 |

LISTA DE FIGURAS

| | página |
|---|--------|
| Figura 1: Fatores de risco para o desenvolvimento de FHD/SCD..... | 22 |
| Figura 2: Esquema do ciclo de replicação do vírus dengue..... | 34 |
| Figura 3: Esquema temporal aproximado da dinâmica da dengue..... | 35 |
| Figura 4: Mapa das áreas de risco de transmissão do vírus dengue..... | 37 |
| Figura 5: Incidência da dengue de acordo com o município de residência. Brasil, Janeiro a Março 2010 e 2011..... | 39 |
| Figura 6: Hipótese da resposta imunológica inata gerada em infecções causadas pelo VDEN..... | 42 |
| Figura 7: Imunopatogenia da Febre Hemorrágica do Dengue..... | 46 |
| Figura 8: Esquema temporal aproximado da dinâmica da viremia e anticorpos IgM-IgG em infecções primárias e secundárias pelo vírus dengue; e métodos de diagnóstico que podem ser usados para detectar a infecção..... | 48 |
| Figura 9: Primatas não humanos (<i>Callithrix penicillata</i>) utilizados no estudo experimental..... | 51 |
| Figura 10: Desenho do estudo experimental com PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente com o VDEN-3 e com o VDEN-2..... | 60 |
| Figura 11: Avaliação do peso corporal dos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2..... | 66 |
| Figura 12: Detecção de anticorpos IgM nos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2. A) Infecção Primária (VDEN-3); B) Infecção Secundária (VDEN-2)..... | 67 |
| Figura 13: Detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IgM e IgG) nos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2..... | 68 |
| Figura 14: Avaliação do eritrograma dos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2..... | 69 |
| Figura 15: Avaliação do leucograma dos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2..... | 70 |
| Figura 16: Contagem de plaquetas e avaliação do coagulograma dos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2..... | 71 |

| | página |
|---|--------|
| Figura 17: Provas bioquímicas de função renal dos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2..... | 72 |
| Figura 18: Provas bioquímicas de função hepática dos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2..... | 73 |
| Figura 19: Detecção de citocinas nos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2..... | 74 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | página |
|--|--------|
| Quadro 1: Principais características e possíveis funções das proteínas do VDEN..... | 31 |
| Quadro 2: Classificação e manifestações clínicas da FHD..... | 36 |
| Quadro 3: Principais funções das citocinas abordadas no estudo experimental..... | 53 |
| Quadro 4: Amostras virais de VDEN de casos de óbitos utilizadas nos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> durante o estudo experimental..... | 57 |
| Quadro 5: Síntese dos achados encontrados nos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2..... | 76 |
| Tabela 1: Índices hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de normalidade para primatas das espécies <i>Callithrix penicillata</i> e <i>Homo sapiens</i> | 52 |
| Tabela 2 Detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IgM e IgG) para os vírus pertencentes ao gênero <i>Flavivirus</i> nos PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2..... | 68 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADE Amplificação dependente de anticorpo
- AG Aparelho de Golgi
- AL Alagoas
- ALT Enzima alanino-aminotransferase
- AM Amazonas
- AP-1 Proteína de ativação 1
- AST Enzima aspartato- aminotransferase
- BA Bahia
- C core
- Cap* capsídio
- CD Cluster de diferenciação celular
- CDs Células dendríticas
- CE Ceará
- CENP Centro Nacional de Primatas
- CEPAN Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
- CNPQ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CpG DNA DNA sintético contendo sequencias CpG
- CREA Creatinina
- C3 Fração C3 do complemento
- C5a Fração C5a do complemento
- C6/36 Linhagem celular continua de mosquito *Aedes aegypti*
- d.C Depois de Cristo
- DGV Dextrose, Gelatina, Veronal
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DNA Ácido desoxirribonucléico
- D.O Densidade óptica
- dsRNA RNA fita dupla
- E Envelope
- ECP Efeito Citopático
- EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELK-1 Enzima estimuladora da transcrição da AP-1
- ES Espírito Santo

EUA Estados Unidos da América
FD Febre do Dengue
FHD Febre Hemorrágica do Dengue
FADESPA Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa
FIOCRUZ Fundação Osvaldo Cruz
HBC Hemoglobina
HCT Hematócrito
HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA Antígeno leucocitário Humano
H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
ICAM Molécula de adesão celular
ICMBio Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ICTV Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IEC Instituto Evandro Chagas IFI
Imunofluorescência indireta IgG
Imunoglobulina da classe G IgM
Imunoglobulina da classe M IH
Inibição da Hemaglutinação IHQ
Imuno Histoquímico
IL- Interleucina
INCT Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
INF- α interferon alfa
INF-R1 Receptor solúvel de interferon
Jak/START Proteína Janus kinases/ proteína START (Transdutor de sinal de transcrição)
Kb Kilobase
KDa Kilodalton
LI Linfócito
LIRAA Índice rápido de infestação por *Aedes aegypti*
LTC Linfócitos T citotóxico
L-15 Meio de cultura Leibowitz modificado
M Membrana
MA Maranhão
MAC-ELISA Ensaio Imunoenzimático para captura de IgM
MG Minas Gerais

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade
MO Monócito
MS Ministério da Saúde do Brasil
 μ L Microlitro
mL Mililitro
N Proteína não estrutural
NE Neutrófilo
NF κ B Fator nuclear κ B
NK Célula Natural Killer
NOD/SCID (Non Obese Diabetic –Severe Combined Immunodeficiency)
NS Proteína não estrutural
OMS Organização Mundial da Saúde
OPAS Organização Pan-Americana de Saúde
ORF Região de leitura aberta
PA Pará
PBS Solução salina tamponada
PE Pernambuco
pH Potencial Hidrogeniônico
PI Piauí
PLT Plaquetas
pM Peptídeo pré-membrana
PM Peso molecular
PNH Primata não humano
RBC Eritrócitos
RER Retículo endoplasmático rugoso
RJ Rio de Janeiro
RNA Ácido Ribonucléico
RNC Região não codificadora
ROR gene related orphan receptor B
rpm Rotações por minuto
RR Roraima
RS Rio Grande do Sul
RTL Receptor *Toll like*
RTPase Proteína serino, protease, helicase e trifosfatase

RT-PCR Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SAARB Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
SAPAT Seção de Patologia
SBF Soro bovino fetal
SCD Síndrome do Choque do Dengue
SEN Soro equino normal
SP São Paulo
ssRNA RNA fita simples
TA Temperatura ambiente
TAP Tempo Ativação de Protrombina
Th Célula T auxiliar
TNF- α/γ Fator de necrose tumoral α/γ
TO Tocantins
TRAF6 Fator associado ao receptor de necrose tumoral
TTPA Tempo de Tromboplastina Parcial Ativa
URE Uréia
VBLM- *Vírus Belém*
VBSQ *Vírus Bussuquara*
VCAR- *Vírus Caraparú*
VCAT- *Vírus Catú*
VCPC *Vírus Cacipacore*
VDEN *Vírus dengue*
VDEN-1 *Vírus dengue sorotipo 1*
VDEN-2 *Vírus dengue sorotipo 2*
VDEN-3 *Vírus dengue sorotipo 3*
VDEN- 4 *Vírus dengue sorotipo 4*
VEEE- *Vírus da Encefalite Equina Leste*
VERO Linhagem de célula derivada de rim de macaco verde africano
VFA *Vírus da febre amarela*
VGUA *Vírus Guaroa*
VICO *Vírus Icoaraci*
VLHI *Vírus Ilhéus*
VMAG *Vírus Maguari*
VMAY *Vírus Mayo;*

VMUC *Vírus Mucambo*

VORO *Vírus Oropouche*

VROC *Vírus Rocio*

VSLE *Vírus da Encefalite Saint Louis*

VTAC *Vírus Tacaiuma*

VUTI *Vírus Utinga*

VWEE- *Vírus da Encefalite Equina Oeste*

WBC Leucócitos

α Alfa

γ Gama

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença infecciosa aguda causada por um arbovírus (vírus transmitido por artrópode) que possui genoma de ácido ribonucléico (RNA) (MURRAY et al., 2000). O *Vírus dengue* (VDEN) é membro do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* e é considerado o arbovírus mais difundido no mundo, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor (GUBLER, 1997a). Por razões climáticas e sociais os países em desenvolvimento possuem geralmente alta taxa de infestação por *Ae. aegypti* e remotas possibilidades de erradicação, o que contribui para o índice de infecção por essa arbovirose, como observado no Brasil (BRASIL, 2002).

O VDEN é transmitido ao homem pela picada das fêmeas de mosquitos hematófagos infectados, principalmente da espécie *Ae. aegypti*. Outros mosquitos do gênero *Aedes*, como *Ae. Albopictus*, *Ae. polynesienses* e *Ae. africanus* têm sido relacionados como transmissores secundários, os dois primeiros na Ásia e o terceiro na África. Artrópodes susceptíveis participam como hospedeiros definitivos permanecendo infectados durante toda a sua vida, e por isso são considerados vetores e reservatórios do VDEN (CAUSEY, 1958).

Na Ásia e nas Américas do Sul e Central a incidência da dengue tem aumentado, observando-se cada vez mais epidemias. Em 2009 e 2010, ocorreram surtos de dengue nas Ilhas Key West na Florida (CDC, 2010) e casos autóctonos foram registrados, em 2010 na região do Mediterrâneo, no sul da França e na Croácia onde até então não se tinha nenhum relato (GJENERO- MARGAN et al., 2011; LA RUCHE et al., 2010). Esses casos de dengue podem ser atribuídos a população de suscetíveis à infecção, a circulação simultânea de diferentes sorotipos do VDEN, o aumento da virulência de algumas cepas circulantes, a difusão do vetor e a outros fatores que influenciam na transmissão do VDEN (PAHO, 2011). No Brasil entre janeiro e março de 2012, foram registrados 76.906 casos da doença, contra 195.894 no mesmo período de 2011 e tanto os casos graves como o número de óbitos reduziram em 96% em 2012 (BRASIL, 2012).

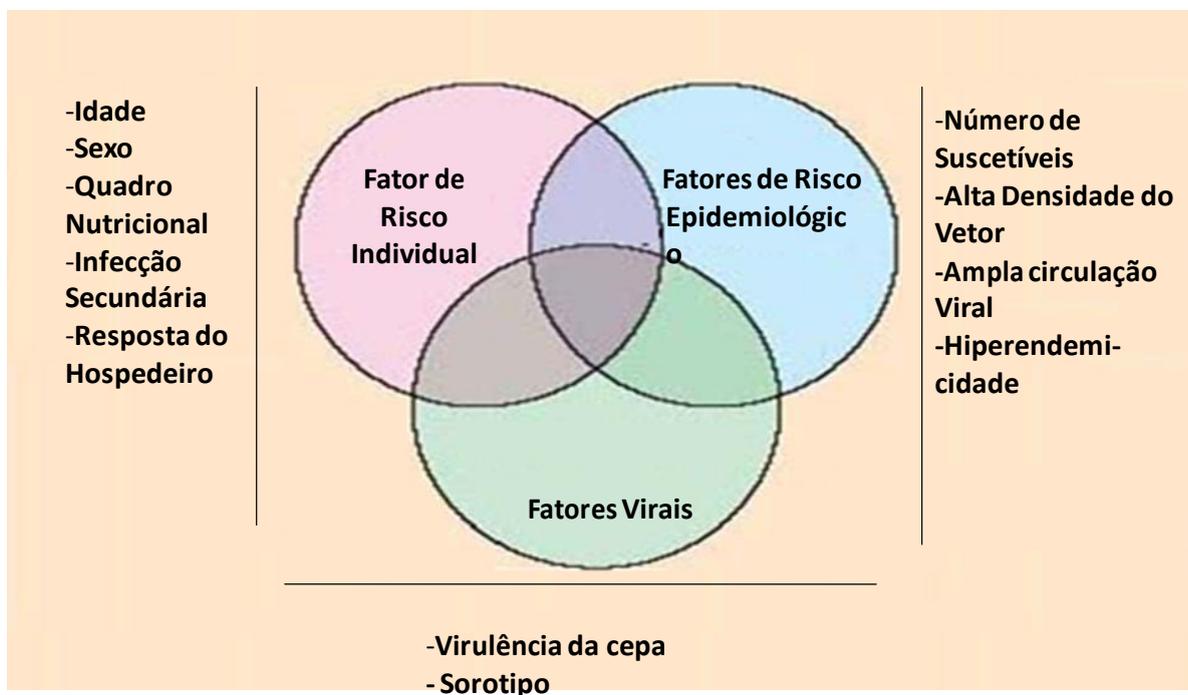
Do ponto de vista patogênico, vários aspectos da fisiopatologia da doença não estão bem compreendidos. Segundo vários pesquisadores, o mecanismo e a existência de um fenômeno imunológico que amplifica a infecção viral nas células macrofágicas do indivíduo a partir da preexistência de anticorpos contra o VDEN, que ao invés de conferir imunidade cruzada para os demais sorotipos, ocasiona alterações imunopatológicas importantes com sintomatologia severa que podem resultar na morte do paciente (HALSTEAD, 1992).

Os indivíduos infectados com o VDEN mostram-se assintomáticos ou desenvolvem quadro clínico, como a Febre do Dengue (FD), que é caracterizada por febre alta, mialgia,

cefaleia, dores articulares e vômitos. Os casos denominados de Febre Hemorrágica do Dengue e/ ou Síndrome do Choque do Dengue (FHD/SCD) iniciam-se de forma semelhante aos casos de FD, porém observa-se o aumento abrupto da permeabilidade vascular que juntamente com a plaquetopenia e as coagulopatias podem levar à morte. A patogenia da FHD é mal compreendida devido à ocorrência de respostas imunológicas atípicas que envolvem a produção de citocinas e quimiocinas, a ativação de células T e o desequilíbrio do sistema de coagulação e da homeostase (SÁNCHEZ et al., 2005).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da FHD/SCD (Figura 1) temos fatores relacionados ao VDEN, como o sorotipo envolvido, a virulência e o tropismo celular, assim como fatores relacionados ao hospedeiro, como idade, resposta do sistema imunológico, sequência de infecções e fatores genéticos (GUBLER, 1998; GUZMAN, 2002; ZOMPI E HARRIS, 2012). A presença de anticorpos facilitadores e a virulência da cepa são dois dos principais fatores propostos para explicar a FHD/SCD. Estudos moleculares sugerem que certas mutações no genoma de alguns genótipos são de extrema importância para o desfecho da doença (COLOGNA E RICO-HESSE, 2003).

Figura 1: Fatores de risco para o desenvolvimento de FHD/SCD.



Fonte: Guzmán e Kourí, 2002.

Há uma enorme carência de modelos que possam explicar de modo satisfatório a interação do VDEN com o hospedeiro, bem como contribuir com o entendimento da fisiopatologia da doença com evidências sólidas que possibilitem traçar perspectivas de incidência e re-infecção, principal fator associado com os casos de FHD/SCD. Recentemente inúmeros estudos sobre dengue foram desenvolvidos ou estão em curso, os quais se concentram: na dinâmica de infecção e controle (epidemiológico, entomológico e de vigilância em saúde pública); na fisiopatogenia e preditores moleculares, genéticos e clínicos (pesquisas pré-clínicas); e no diagnóstico, terapêutica, vacina e manejo clínico. Mesmo com grandes avanços, o número de estudos sobre dengue é incipiente para suprir as necessidades de conhecimentos geradas pelo grande número de casos da doença (BRASIL, 2010a).

2 JUSTIFICATIVA

A dengue constitui a mais importante e difundida doença viral transmitida por vetores no mundo. No Brasil, o surgimento de epidemias e o crescente número de casos graves em adultos e em menores de 15 anos estão intimamente relacionados à urbanização desordenada, ao ineficiente controle vetorial, seja pelo surgimento de mosquitos e larvas de mosquitos *Ae. aegypti* resistentes a diversos inseticidas e larvicidas, seja pelo deficiente serviço de saneamento ambiental nos espaços urbanos locais onde ocorre a dengue. As anuais epidemias de FD e a gravidade de quadros de FHD/SCD tornam prioritários estudos que promovam o esclarecimento dos fatores envolvidos na patogenia da doença, assim como ações que propiciem a redução da transmissão da dengue.

Atualmente não existe vacina licenciada contra a dengue, a qual auxiliaria na redução das taxas de prevalência e incidência o que contribuiria para o controle da circulação do VDEN. As perspectivas de estudos que viabilizem um modelo experimental para pesquisa sobre o VDEN e que possam ser usados em testes pré-clínicos de uma vacina tetravalente é de enorme importância. Além disso, um modelo experimental eficiente poderá gerar enorme conhecimento científico acerca da patogenia e fisiopatologia da doença e dos quadros de doença causado pelos sorotipos do VDEN.

Apesar de muitos esforços ao longo das últimas décadas para se encontrar um modelo experimental que sirva para estudos da patogênese do VDEN, este continua sendo um desafio. O modelo ideal deve ser suscetível à infecção pelo VDEN e imunologicamente capaz de desenvolver os sinais clínicos da doença, semelhante ao que é observado em humanos. O ideal seria um modelo que desenvolvesse FHD/SCD, após uma infecção secundária (heteróloga), e que permitisse elucidar o mecanismo pelo qual ocorre a reação cruzada entre os anticorpos, a forma com que os linfócitos T contribuem para a patogênese da infecção secundária, o perfil imunológico da resposta celular e humoral predominante durante as infecções consecutivas, e ainda de que forma esse atuaria na neutralização do VDEN e na severidade dos sinais e sintomas.

Em 2008 e 2009, no Instituto Evandro Chagas (IEC), localizado no Estado do Pará (PA), para esclarecer o óbito de um primata não humano (PNH) do gênero *Callithrix*, ocorrido durante uma epizootia em Lauro de Freitas-Bahia (BA), submeteu amostras de tecidos a exame histopatológico. Este demonstrou que as lesões não eram compatíveis com o diagnóstico de febre amarela (principal suspeita), e sim, similarmente às aquelas observadas em humanos com quadro de FHD/SCD. Para confirmação realizou-se teste imuno-histoquímico (IHQ) para a pesquisa de antígenos do VDEN, utilizando anticorpos policlonais, cujo

resultado foi positivo, sendo este considerado o primeiro caso diagnosticado como FHD em PNH (DE BARROS, 2009). O relato foi considerado de extrema importância, pois se tratava de infecção natural em uma espécie silvestre. Diante deste contexto, o presente projeto de dissertação se propôs a desenvolver estudo experimental em PNH da espécie *Callithrix penicillata* com intuito de avaliar a aplicabilidade desses animais como um possível modelo experimental para estudos do VDEN. O VDEN-3 e o VDEN-2 foram eleitos para o estudo devido evidências virológicas e epidemiológicas que indicam que infecções sequenciais quando causadas por esses sorotipos, estão mais frequentemente associadas à ocorrência de FHD/SCD (WHO, 2009; ROTHMAN, 2010)

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HISTÓRICO

É difícil discernir onde e quando ocorreu o evento de cruzamento entre as espécies que levou ao aparecimento de infecção causadas pelo VDEN em humanos (VASILAKIS et al., 2011). Nas Américas, a dengue foi documentada pela primeira vez no final do século XVIII, e é provável que a sua chegada no continente tenha sido resultado do comércio de escravos. A associação entre o vírus e o tráfico de escravos, leva à conclusão de que o VDEN surgiu nas florestas da Europa Central e da África Ocidental, região em que os escravos foram retirados e onde os PNH eram abundantes (HIRSCH, 1883 *apud* GUBLER, 1997a; EHRENKRANZ et al., 1971, VASILAKIS, et al., 2011). Outros autores propõem que o VDEN teria se originado na Península Malay, na Malásia, a partir de um ciclo silvestre em floresta, envolvendo PNH e mosquitos de copas de árvores (RUDNICK E LIM, 1986; HALSTEAD, 1992).

O ciclo de transmissão do ancestral silvestre do VDEN ainda existe e é mantido em PNH e espécies silvestres de mosquitos do gênero *Aedes* em florestas do Sudeste Asiático e África Ocidental (VASILAKIS et al., 2011). A existência de ciclos silvestres da dengue tem sido amplamente documentada no Sudeste Asiático e na África, e envolvem diversos gêneros de PNH e mosquitos do gênero *Aedes* de pelo menos três subgêneros (*Stegomyia*, *Finlaya* e *Diceromyia*) (GUBLER, 1989; GUBLER, 1997a, b, VASILAKIS E WEAVER, 2008).

Qualquer que tenha sido a origem do VDEN sabe-se que seus sorotipos (quatro distintas espécies virais: sorotipo 1 (VDEN-1), sorotipo 2 (VDEN-2), sorotipo 3 (VDEN-3) e sorotipo 4 (VDEN-4) são antigenicamente distintos, mas geneticamente relacionados (VASILAKIS et al., 2011). Os quatro sorotipos do VDEN que circulam entre os seres humanos emergiram independentemente a partir de ancestrais progenitores silvestres que estavam presentes em PNH, após o estabelecimento das populações humanas (VASILAKIS et al., 2011). No entanto, o contato ecológico entre ciclos silvestre e populações humanas é mal compreendido, e a doença causada por cepas silvestres do VDEN é desconhecida (VASILAKIS et al., 2011).

A palavra dengue é originária da Espanha, onde foi assim denominada em torno de 1800. Na África (Zanzibar), a dengue recebeu o nome de **Ki Denga Pepo**, ou **Denga**, em 1823 (GUBLER, 1997a). A FD é conhecida como entidade clínica desde o século XVIII e, possivelmente em séculos anteriores, pois se acredita que o termo **Water Poison** cunhado na China em 992, refere-se às epidemias de dengue (GUBLER, 1997a).

Ainda que o reconhecimento clínico tenha ocorrido no século XVIII, que a natureza viral da infecção tenha sido definida pelos trabalhos de Ashburn e Craig (1907), e que

houvesse a suspeita de tratar-se de uma doença transmitida por mosquitos, à confirmação etiológica da enfermidade da FD só foi obtida após o isolamento do VDEN-1 efetuado por pesquisadores japoneses e por Sabin na amostra *Hawaii*, em 1944 e do VDEN-2, na amostra *New Guinea B, C e D*, em 1944 (KIMURA E ROTTA, 1944; SABIN, 1952; KARABATSOS, 1985). Posteriormente, durante a epidemia de FHD nas Filipinas foram isolados o VDEN-3, por Sather (1956). E em 1960, o VDEN-4 por Hammon e colaboradores (KARABATSOS, 1985).

3.2 MODELOS EXPERIMENTAIS

A descoberta de modelos animais adequados para estudos da infecção pelo VDEN tem sido dificultada pela infectividade limitada e pela baixa ou ausência de replicação do VDEN em espécies animais diferentes da humana. Camundongos e PNH são viáveis e cada modelo pode ser usado para diferentes aplicações. Os PNH não desenvolvem todos os sinais clínicos da dengue. Contudo, o VDEN infecta células relevantes o que os tornam um modelo adequado para os estudos da resposta imunológica. Em contraste, camundongos imunodeficientes infectados com cepas adaptadas de VDEN mostram sinais de doenças grave semelhante aos observados em humanos com FHD/SCD, o que favorece o uso desses animais em estudos de antivirais e de testes de vacinas em ensaios pré-clínicos (ZOMPI E HARRIS, 2012).

Um modelo experimental que apresente alterações clínicas fidedignas ao quadro observado em humanos com FD ou FHD/SCD é indispensável para a compreensão da fisiopatologia e da severidade da doença. Estudos experimentais que utilizam PNH do Velho Mundo observaram poucos sinais de doença e uma resposta de anticorpos qualitativamente semelhante à encontrada em humanos (KOCHEL et al., 2005; MONATH et al., 2005). Os PNH tornam-se virêmicos após inoculação subcutânea do VDEN, porém o tempo de duração da viremia é menor que o observado em humanos (KOCHEL et al., 2005; MONATH et al., 2005; BERNARDO et al., 2007; ZOMPI E HARRIS, 2012). Thoisy e colaboradores (2009) descreveram a identificação do VDEN em diversos grupos de animais da Guiana Francesa, mas a interpretação de seus resultados requer cuidado, pois sempre se soube que aves, roedores, marsupiais, entre outros, são refratários ao VDEN.

Chimpanzés e outros macacos ao serem infectados podem desenvolver títulos de viremia capazes de infectar mosquitos e de causar epizootias (SCHERER et al., 1978; DE SILVA, 1999; BERNARDO et al., 2007). Um estudo recente relatou sinais de hemorragia em macacos *Rhesus*, infectados com uma dose elevada de uma cepa do VDEN-2 (ONLAMOON

et al., 2009). Vários estudos relatam que animais infectados com VDEN desenvolvem viremia transitória e produzem anticorpos contra o VDEN (BLANEY et al., 2005; SUN et al., 2006; ONLAMOON et al., 2009). No entanto, nem todos os PNH infectados com VDEN desenvolvem níveis claros de viremia, bem como não apresentaram sinais clínicos da doença (ITO et al., 2010). Vários aspectos incluindo período de incubação, duração da viremia e resposta de anticorpos em saguis infectados experimentalmente com VDEN parecem reproduzir as infecções causadas pelo VDEN em humanos (VAUGHN et al., 1997).

Omatsu e colaboradores (2011) desenvolveram estudos com saguis (*Callithrix jacchus*) e observaram altos níveis de viremia após inoculação sequencial com um dos quatro sorotipos de VDEN no mesmo animal, bem como detectaram a proteína não estrutural 1 (NS1), imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) e isolaram genoma do VDEN-2 em amostras de urina, fígado, baço, timo, órgãos linfóides. Após aproximadamente 6 meses todos os PNH foram reinoculados com VDEN-2 e não foi detectado proteína NS1 no plasma dos saguis. Esses achados sugerem que a imunidade protetora foi induzida pela infecção primária induzindo proteção aos animais conforme relatado em infecções em humanos (MIZUNO et al., 2007; POLONI et al., 2010; OMATSU, 2011).

Nos últimos anos, muitos progressos foram alcançados pelas pesquisas que utilizam como modelo experimental camundongos. De fato, camundongos infectados com certas cepas do VDEN pela via intracerebral resultam em doença com características semelhante as observadas em humanos, como viremia, febre, hemorragia, trombocitopenia, elevação dos níveis do fator de necrose tumoral (TNF- α) e paralisia flácida (MARTINEZ, 2005; YAUCH E SHRESTA, 2008; TAN et al., 2010). O principal obstáculo para a utilização de camundongos como modelo experimental para o VDEN é a falta de cepas do VDEN do tipo selvagem que sejam capazes de se replicar em camundongos. Isso se deve ao fato desses animais serem naturalmente resistentes à infecção pelo VDEN, especialmente aos isolados de infecções em humanos (YAUCH E SHRESTA, 2008).

Estudos experimentais que utilizaram camundongos geneticamente modificados, como os camundongos NOD/SCID (do inglês *Non Obese Diabetic –Severe Combined Immunodeficiency*) que combinam deficiência dos sistemas imunológicos, adaptativo e inato, demonstraram sintomatologia semelhante à FD (BENTE et al., 2005; BENTE E RICO-HESSE, 2006). O cultivo de monocamadas de células endoteliais em interação com o VDEN é um modelo experimental muito aceito e utilizado nos estudos de FHD/SCD (PAYREFITTE, 2006). Sabe-se, porém, que o método de obtenção das células e o meio de cultura utilizado

podem alterar os resultados, como visto em alguns trabalhos com o Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês *Human Immunodeficiency Virus- HIV*) *in vitro* (DHAWAN, 1997).

3.3 TRATAMENTO E PROFILAXIA

Até o momento, nenhuma droga antiviral contra o VDEN foi comercializada (ZOMPI E HARRIS, 2012). Em 2005, Whitby e colaboradores observaram que a Castanospermine inibia a conformação de proteínas virais, diminuía a secreção viral e a mortalidade de camundongos infectados com VDEN pela via intracerebral. Essa mesma droga, juntamente com outros antivirais foi testada em camundongos AG129 e mostraram-se eficazes, reduzindo a carga viral e a resposta inflamatória (SCHUL et al. 2007).

As vacinas contra o VDEN desenvolvidas até o momento são de vírus vivos atenuados, vírus inativados ou de subunidades virais que utilizam proteínas do envelope (E) ou do peptídeo pré-membrana (pM) ou ainda a proteína NS1. (CLEMENTS et al., 2010; MELLADO-SANCHEZ et al., 2010). Vacinas de vírus vivos atenuados podem ser testadas em camundongos devido ao baixo nível de replicação viral nesses animais. Camundongos imunocomprometidos infectados com VDEN pela via intracerebral desenvolvem sinais neurológicos e paralisia, o que favorecem a avaliação da eficácia da vacina (ZHENG et al., 2011). Johnson e colaboradores, em 1999 observaram que camundongos A129, sustentam a replicação do VDEN, apresentam anticorpos totais específicos de longa duração e de proteção homólogos e heterólogos. Estudos de vacinas terapêuticas que utilizaram camundongos imunocomprometidos obtiveram bons resultados. No entanto, esses animais desenvolveram níveis de viremia limitados mesmo quando altos títulos de VDEN foram inoculados (BALSITIS et al., 2010; SHRESTHA et al., 2010). Os PNH são muito úteis para os estudos de replicação e imunogenicidade em vacinas de vírus vivos atenuados (DURBIN et al., 2011; OSORIO et al., 2011). Macacos *Rhesus*, *Cynomolgus* e *Owl* têm sido candidatos a modelos em estudos de vacinas (KORAKA et al., 2007).

3.4 ETIOLOGIA

Segundo o oitavo relatório do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), o VDEN pertence ao gênero *Flavivirus*, à família *Flaviviridae* (CITV, 2005). A classificação taxonômica é realizada em função das propriedades físicas, químicas e biológicas. Os critérios sorológicos foram utilizados para a classificação antigênica no grupo B e mais recentemente, estudos moleculares das sequências de nucleotídeos do genoma dos sorotipos do VDEN permitiram a classificação desses em diferentes genótipos (LINDENBACH et al., 2007; VASILAKIS E WEAVER, 2008; WEAVER E VASILAKIS, 2009).

As partículas virais do VDEN são esféricas com 50 a 60 nm de diâmetro, constituídas por um core de ribonucleoproteínas que é envolto por um envelope de lipoproteínas com aproximadamente 10 nm de espessura. O genoma do VDEN consiste em uma fita única de RNA (ssRNA) com cerca de 11 kilobases (kb) e, por possuir polaridade positiva, comporta-se na célula hospedeira infectada como RNA mensageiro (CHAMBERS et al., 1990).

O genoma do VDEN possui uma única sequência de leitura aberta (do inglês *Open Read Frame-ORF*) com 10.233 nucleotídeos que orienta a síntese de uma longa poliproteína, a qual pode ser clivada por proteases virais e celulares dando origem a proteínas estruturais e não estruturais individuais (VAN REGENMORTEL et al., 2000). De fato, esses genes codificam dez proteínas virais, incluindo três estruturais designadas: C (proteína do core viral), M (proteína da membrana e seu precursor intracelular prM) e E (proteína do envelope viral) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), responsáveis pelas atividades regulatórias e pela expressão viral, incluindo replicação, virulência e patogenicidade (ROTHMAN, 2004). Nas extremidades 5' e 3' existem regiões não codificadoras (RNC), com aproximadamente 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente. Tais regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de replicação genômica, tradução e empacotamento viral (CHAMBERS et al., 1990; VAN REGENMORTEL et al., 2000). O quadro 1 cita as principais características e possíveis funções das proteínas do VDEN.

Quadro 1: Principais características e possíveis funções das proteínas do VDEN.

(Continua)

| Proteína | Características | Possíveis funções |
|-----------------|---|--|
| C | Proteína do nucleocapsídeo viral; Peso molecular 13 kDa. | Formação do precursor do nucleocapsídeo e ligação do RNA; Não é capaz de produzir anticorpos neutralizantes, porém induz a produção de anticorpos fixadores do complemento. |
| prM | Precursora da proteína M; Presente na membrana de partículas virais imaturas; Peso molecular 27-31 kDa. | Talvez esteja envolvida na morfogênese e transporte viral; Em conjunto com a proteína E, previne a catalisação por proteases celulares. |
| M | Proteína de membrana das partículas virais maduras. | Componente associado à ligação e introdução do vírus na célula. |
| NS1 | Corresponde ao antígeno fixador do complemento; É altamente conservada; Peso molecular 46 kDa. | Participa da maturação da partícula viral; Participa na indução de anticorpos protetores; É expressa no início da infecção sendo detectada na membrana plasmática das células infectadas e em fluídos corpóreos. |
| NS2a | Hidrofóbica e pouco conservada; Peso molecular 22 kDa. | Participa na replicação do RNA viral; Participa no processo de maturação da NS1; É co fator do domínio de helicase da NS3. |
| NS2b | Hidrofóbica e pouco conservada; Peso molecular 14 kDa. | Possível componente da protease/ replicase; É cofator do domínio de serina protease da NS3; Modula a permeabilidade da membrana durante a infecção viral. |
| NS3 | Altamente conservada; Peso molecular 70 kDa. | Multifuncional: processa a poliproteína; Participa na clivagem das proteínas: serina protease, helicase e trifosfatase (RTPase); Participa da replicação do RNA e na formação do cap na extremidade 5'. |
| NS4a | Hidrofóbica e pouco conservada; Peso molecular 16 kDa. | Cofator do complexo de replicação; Esta associada à membrana. |

(conclusão)

| Proteína | Características | Possíveis funções |
|-----------------|---|---|
| NS4b | Hidrofóbica e pouco conservada; Peso molecular 17 kDa. | Possível componente da replicase. |
| NS5 | É a maior e a mais conservada proteína dos flavivírus; Localiza-se no citoplasma; Peso molecular 130 kDa. | RNA polimerase-dependente de RNA; Participa no processamento da adição do cap. |

Fonte: Adaptado de Chambers et al., 1990; Monath e Heinz, 1996; Lindenbach e Rice, 2003; Van Regenmortel et al., 2000; Lindenbach et al., 2007.

3.5 REPLICAÇÃO VIRAL

Na infecção natural a replicação viral pode ser detectada aproximadamente 15 horas após a infecção pelo VDEN (NOISAKRAN E PERNG, 2008). Monócitos, macrófagos e células dendríticas (CDs), incluindo as células de Langerhans do tegumento, são os principais alvos da infecção pelo VDEN. Após a infecção essas células migram para os linfonodos e outros órgãos linfóides (JESSIE et al., 2004; LEONG et al., 2007). Células dendríticas apresentam os antígenos virais aos linfócitos T CD4⁺ e esses ativam macrófagos que migram para o sítio de infecção, iniciando o processo de fagocitose (CHATURVEDI et al., 2006). Os macrófagos são intensamente infectados pelos vírus, no entanto, supõe-se que outras células de outros tecidos também sejam alvos da replicação viral onde há células diferenciadas da linhagem monócitos-macrófagos, como é o caso das células de Kupffer do fígado (CHATURVEDI et al., 2006).

A entrada do VDEN em macrófagos pode ocorrer: i) pela interação da proteína E com receptores celulares; ii) pela opsonização da partícula viral por anticorpos, sendo internalizado via receptores Fc, o que aumenta a internalização dos VDEN, assim como o título viral nas células macrofágicas, caracterizando o efeito imunofacilitador do anticorpo; iii) ou, por endocitose mediada por clatrina. Entretanto, estudos recentes demonstraram que o VDEN, dependendo do sorotipo e/ou do tipo de célula alvo, é capaz de utilizar uma via alternativa de internalização, independente de clatrina (ACOSTA et al., 2008).

Uma vez internalizado após a endocitose, o conteúdo do nucleocapsídeo é liberado no citoplasma. Esse nucleocapsídeo desprovido de envelope sofre a ação de enzimas celulares, expondo o genoma viral (CHAMBERS et al., 1990; HENCHAL E PUTNAK, 1990;

RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). O genoma viral exposto no citoplasma da célula hospedeira participa de três processos distintos: atua como RNA mensageiro direcionando a síntese de proteínas virais; serve como fita molde para a replicação do genoma; e, por fim, será envolto por proteínas virais que compõem a partícula viral (RICE, 1996; HARRIS et al., 2006). O genoma viral é traduzido em uma longa poliproteína que, por sua vez, é clivada por proteases celulares originando as proteínas estruturais e não estruturais. A NS3 por ser uma serinaprotease é a responsável pela clivagem das proteínas não estruturais, ao passo que a clivagem das proteínas estruturais é realizada pela peptidase das células hospedeiras (LINDENBACH E RICE, 2003).

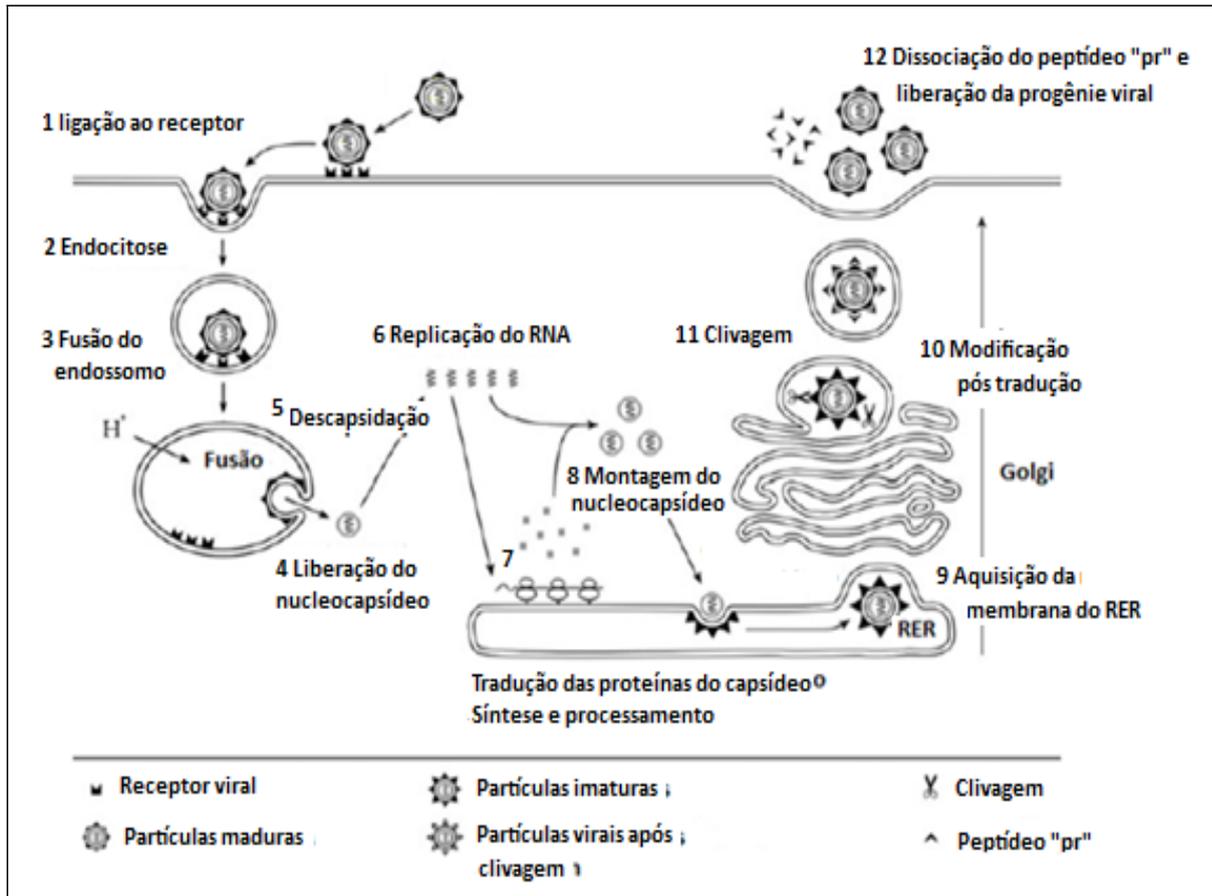
A replicação inicia com a interação entre NS5, o RNA genômico e alguns fatores celulares. O processo começa com a síntese da fita de RNA negativa intermediária, a qual serve de molde para a síntese de novas fitas de RNA genômicas de polaridade positiva (HENCHAL E PUTNAK, 1990; LINDENBACH E RICE, 2003). Presume-se que a atividade da RNA trifosfatase da NS3, desfosforila a região 5' do RNA genômico, preparando-o para receber o cap sintetizado pela NS5 (HEINZ E ALLISON, 2003).

O RNA recém-sintetizado é posteriormente embalado pela proteína C formando o nucleocapsídeo. Segundo Chambers e colaboradores (1990), o domínio básico da proteína C interage com o ssRNA para formar o nucleocapsídeo, e o segmento hidrofóbico desta proteína funciona como sítio de ancoragem para o precursor prM e para a proteína E que, desta forma, interagem com a membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) para compor o envelope. O precursor prM e a proteína E quando formadas são orientadas para o lúmen do RER, onde se associam à proteína C, formando um trímero que orienta o VDEN ao brotamento. O encapsulamento do nucleocapsídeo não é crucial para a formação e liberação de partículas virais, isto porque partículas subcapsuladas têm sido frequentemente documentadas (RODENHUIS- ZYBERT et al., 2010).

As partículas virais são transportadas através de uma via secretória ao aparelho de Golgi (AG). O pH ligeiramente ácido (~5,8 - 6,0) do AG provoca dissociação do peptídeo prM e da proteína E heterodímero. Esta reorganização estrutural global das proteínas permite que endonucleases celulares dissociem o precursor prM, levando a geração da proteína M e do peptídeo "pr". Estudos recentes mostram que o peptídeo "pr" permanece associado à partícula viral até o mesmo ser secretado para o meio externo e que, juntamente com a proteína M, atua na estabilização da proteína E, durante o trânsito na via secretória, impedindo mudanças conformacionais que possibilitem a proteína E fundir-se com a membrana (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). Além disso, o precursor prM é importante para a estabilização do pH

ácido devido as suas propriedades de fusão viral, hemaglutinação e infectividade (HEINZ E ALLISON, 2003). Após a dissociação com o peptídeo "pr" vírions maduros são secretados para o meio externo (Figura 2).

Figura 2: Esquema do ciclo de replicação do vírus dengue.

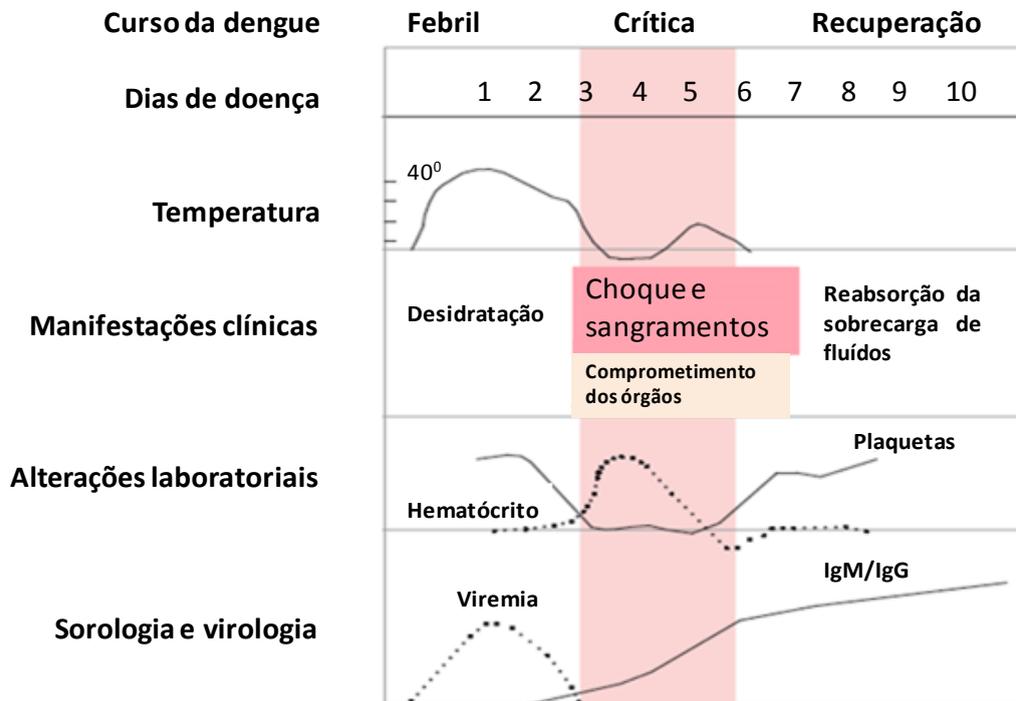


Fonte: Adaptado de Rodenhuis-Zybert et al., 2010.

3.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A sintomatologia causada pelo VDEN inicia após um período de incubação médio que varia de 2 a 8 dias (FONSECA E FIGUEIREDO, 2009). A infecção pelo VDEN pode ser assintomática ou apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo quadros hemorrágicos com ou sem choque (SOUZA et al., 2008). O quadro clínico inicia abruptamente, e geralmente é seguido por três fases: febril, crítica e recuperação (Figura 3) (WHO, 2009).

Figura 3: Esquema temporal aproximado da dinâmica da dengue.



Fonte: Adaptado de Yip, 1980.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em uma abordagem que visa fornecer informações sobre conduta clínica, controle vetorial, diagnóstico laboratorial, vigilância, entre outros, classificou a doença em febre do dengue e dengue severa (WHO, 2009). Contudo, o Ministério da Saúde do Brasil (MS) em sua publicação *Dengue: diagnóstico e manejo clínico-Adulto e criança (2007)* reconhece três formas de apresentação da doença: a FD, a FHD/SCD e dengue com complicações (BRASIL, 2007).

A FD é uma doença aguda e autolimitada. É associada à ocorrência de febre ($\geq 38,5$ °C) que dura aproximadamente 2-7 dias, dor retro orbitária, cefaleia de grau variável, erupção maculopapular, dores musculares e articulares, frequentemente acompanhada por leucopenia. Ressalta-se que esses sintomas são observados na maioria dos pacientes (WHO, 2001; SILVA E ANGERAMI, 2007; OMATSU et al., 2011; SIMMONS et al., 2012).

A FHD/SCD apresenta inicialmente sintomatologia semelhante à FD, no entanto, entre o segundo e o quarto dia de doença, durante o período de defervescência, observa-se o extravasamento de líquidos para o interstício que resultam em derrame cavitário e plaquetopenia. É observada ainda a ocasional diminuição da pressão diferencial que provoca tonturas, sudorese fria e taquicardia, bem como dores abdominais e fenômenos hemorrágicos (prova do laço positiva, petéquias, gengivorragia, sangramento gastrointestinal, hematúria e metrorragia). Nos casos graves pode ocorrer grande diminuição de volume plasmático

intravascular e, conseqüente, choque hipovolêmico que pode levar a morte (NOISAKRAN E PERNG, 2008; BRASIL, 2010b; SIMMONS et al., 2012).

Segundo o MS, a FHD é diagnosticada quando se observa após a presença de febre intermitente por 2 a 7 dias, fenômenos hemorrágicos, trombocitopenia (≤ 100.000 células/mm³) com hemoconcentração, hematócrito (HCT) com aumento de 20% do valor basal ou valores superiores a 45% em crianças, 48% em adultos do gênero feminino e 54% em adultos do gênero masculino e/ou presença de derrame pleural, pericárdico, ascite ou hipoalbuminemia (BRASIL, 2010b; SIMMONS et al., 2012). A FHD é classificada de acordo com critérios clínicos, conforme descrito no quadro 2.

Quadro 2: Classificação e manifestações clínicas da FHD.

| Classificação | Manifestações clínicas da FHD/SCD |
|----------------------|---|
| Grau I | Febre acompanhada de sintomas não-específicos, em que a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva. |
| Grau II | Manifestações do grau I acrescidos de sangramentos espontâneos normalmente no tegumento, petéquias, epistaxe, gengivorragia, entre outros. |
| Grau III | Manifestações de colapso circulatório com brusca diminuição da pressão sanguínea (< 20 mm Hg) ou hipotensão arterial. |
| Grau IV | Choque profundo com pressão arterial e pulso imperceptível. Cabe ressaltar que a FHD compreende todos os quatro graus, sendo os dois últimos considerados como SCD. |

Nota: FHD=Febre Hemorrágica do Dengue; SCD=Síndrome do Choque do Dengue.

Fonte: Mcbridea e Bielefeldt-Ohmannb, 2000; Brasil, 2009; Brasil, 2010b.

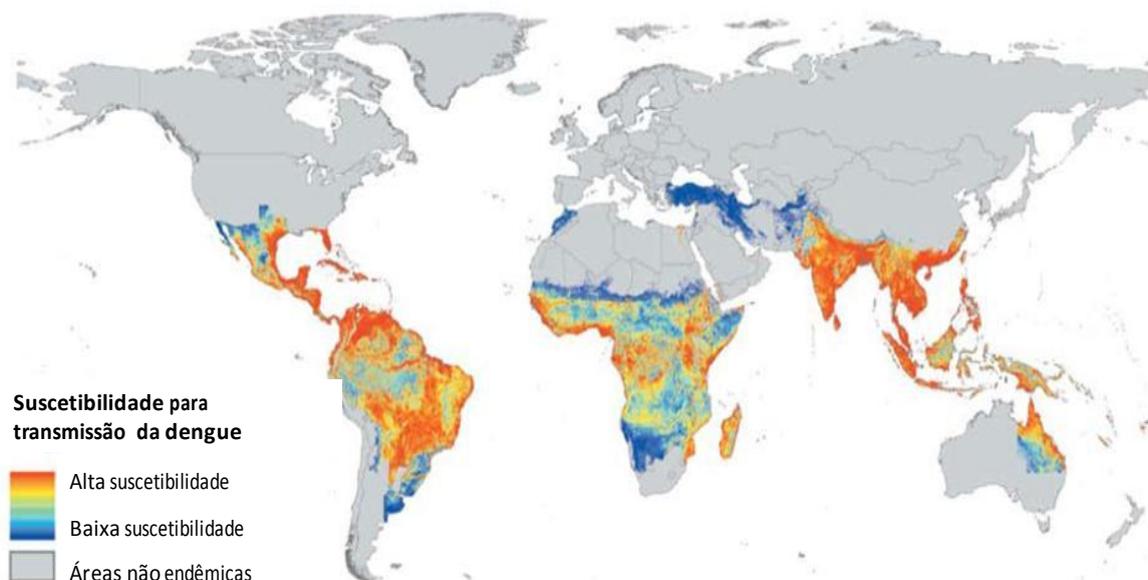
É considerado dengue com complicações todo caso de dengue que não se enquadra nos critérios de FHD do MS, e quando a classificação de FD é insatisfatória devida o potencial de risco. Nessa situação, a presença de um dos itens clínicos e/ou laboratoriais descritos a seguir caracteriza o quadro: alterações neurológicas, disfunção cardiorrespiratória, insuficiência hepática, hemorragia digestiva significativa (volumosa); derrame pleural, pericárdico e ascite, trombocitopenia inferior a 20.000/mm³ ou leucopenia igual ou inferior a 1.000/mm³ (BRASIL, 2007; 2010b).

3.7 EPIDEMIOLOGIA

Os primeiros surtos de dengue foram reportados no final do século XVIII, mais especificamente entre os anos de 1779 e 1780, em Java (sudoeste asiático), na Filadélfia (Estados Unidos da América-EUA) e no Cairo e Alexandria (Egito). A primeira epidemia de FHD ocorreu em 1953 nas Filipinas, e causou a morte de 40% dos infectados que sofriam de hemorragias graves e/ou choque (GUBLER, 1998; GUBLER, 2006; VASILAKIS E WEAVER, 2008; BHARAJ et al., 2008).

Nas Américas o VDEN circula desde o século XVIII, porém nas primeiras décadas do século XX ocorreu um silêncio epidemiológico que coincidiu com a campanha para a eliminação da transmissão urbana da febre amarela. Somente na década de 1960 registrou-se a reintrodução nas Américas do VDEN-2 e do VDEN-3, que foram associados à ocorrência de várias epidemias de FD (GUBLER, 1987; TEXEIRA et al., 1999). Atualmente os quatro sorotipos do VDEN circulam nas Américas (TEMPORÃO et al., 2011). A OMS estima que em torno de 2,5 bilhões de pessoas se encontram na área de risco e desse total, 50 milhões serão infectados pelo VDEN anualmente (Figura 4) (HALSTEAD, 1997; PAHO, 2011). Nas Américas até a sétima semana epidemiológica de 2012 foram registrados 62.643 casos da doença, desses 899 graves e 69 óbitos, uma redução de 35,4% dos casos quando comparado ao mesmo período de 2011. Entre os países das Américas o Brasil lidera o número de registros da doença com 40.486 casos e 32 óbitos (PAHO, 2011; PAHO, 2012).

Figura 4: Mapa das áreas de risco de transmissão do vírus dengue.



Fonte: Simmons et al., 2012.

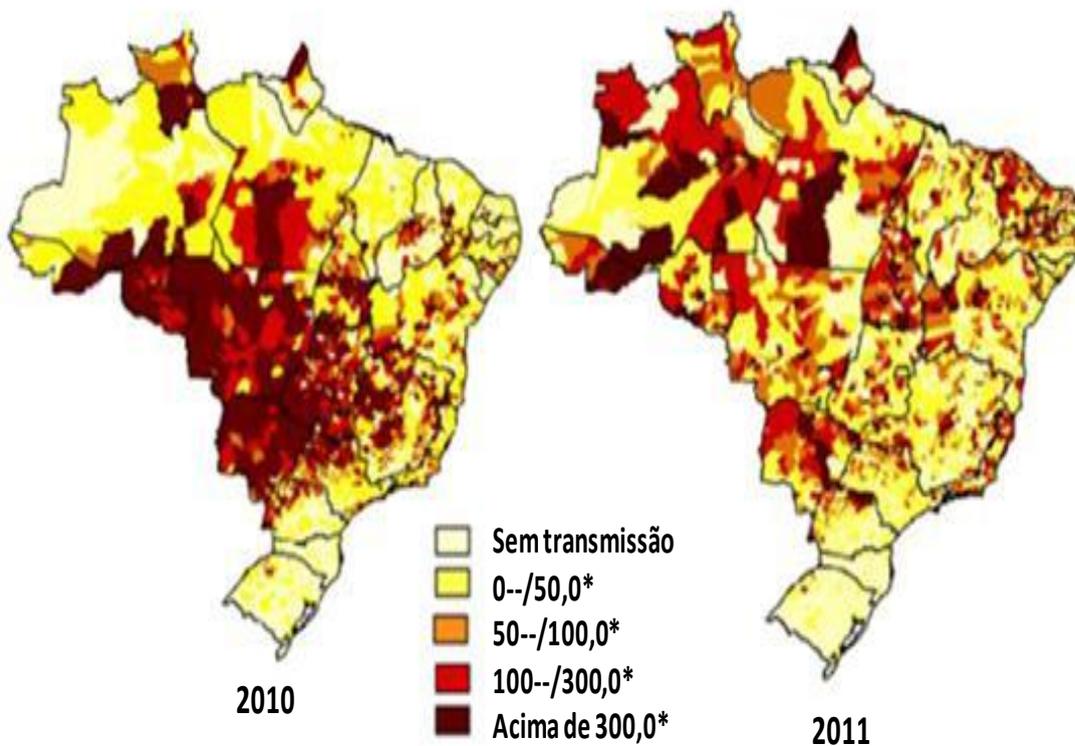
No Brasil há referências de epidemias de dengue desde o século XIX (FONSECA E FIGUEIREDO, 2009). No século XX, há registro da doença no Estado de São Paulo (SP) (1916) e em Niterói no Estado do Rio de Janeiro (RJ) (1923). Contudo, sem diagnóstico laboratorial. A primeira epidemia com confirmação laboratorial ocorreu em Boa Vista-Roraima (RR) (1981-1982) e foi causada pelos sorotipos VDEN-1 e VDEN-4, que provavelmente foram introduzidos no Brasil a partir de países vizinhos da América do Sul. O surto foi controlado devido a um esforço nacional para o controle da densidade vetorial (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1982; OSANAI et al., 1983; OSANAI, 1984; SILVA JÚNIOR E PIMENTA JÚNIOR, 2008; BRASIL, 2009). Em 1986 foi registrada a ocorrência de epidemias pelo VDEN-1, inicialmente no RJ, disseminando-se rapidamente, no primeiro momento para os Estados de Alagoas (AL) e Ceará (CE) e depois para outros Estados (SILVA JÚNIOR E PIMENTA JÚNIOR, 2008; FONSECA E FIGUEIREDO, 2009). Durante a década de 1990 ocorreu um aumento significativo da incidência da doença, reflexo da ampla dispersão vetorial e da introdução do VDEN-2. Os primeiros casos da doença ocorreram no RJ (1990) e posteriormente em Tocantins (TO) e AL (1991), BA e CE (1994) (NOGUERA et al., 1995; VACONCELOS et al., 1995; VACONCELOS et al., 1999). Em 1990 e 1991, o VDEN-2 provocou no RJ uma epidemia com grande número de casos de FHD, os quais provavelmente ocorreram em pessoas previamente expostas ao VDEN-1 durante as epidemias dos anos anteriores (NOGUEIRA et al., 1993; SILVA JÚNIOR E PIMENTA JÚNIOR, 2008).

Em 2000 foi isolado pela primeira vez o VDEN-3 de um caso importado em São Paulo (ROCCO et al., 2001) e em seguida ocorreram casos autóctones no RJ (2000-2001), em RR (2001) e posteriormente em vários outros Estados (BRASIL, 2010c). Pinheiro e colaboradores (2005) detectaram a circulação de VDEN-3 em Manaus- Amazonas (AM) em lotes de mosquitos *Ae. aegypti* em períodos entre a ocorrência de epidemias na Região Norte do Brasil. Nesse período, diante da cocirculação dos três sorotipos do VDEN no território brasileiro, observou-se o aumento da gravidade dos quadros clínicos, principalmente após a introdução do VDEN-3 (CASTRO et al., 2003a; CASALI et al., 2004; NETO et al., 2004; MONTENEGRO et al., 2006).

No período compreendido entre 1982 a 2008 foram registrados cerca de 8 milhões de casos de FD, aproximadamente 10 mil casos de FHD e cerca de 3 mil óbitos no Brasil (WHO, 2009). De janeiro a outubro de 2010, os casos de dengue no país aumentaram 189,8% em relação ao mesmo período de 2009 (BRASIL, 2010d). A Figura 5 apresenta a incidência de dengue de acordo com o município de residência, nos meses de janeiro a março de 2010 e

2011. Em 2010, observou-se alta transmissão na região Centro-Oeste e em 2011, no mesmo período, observou-se a elevada difusão da doença em todas as regiões do país (BRASIL, 2010e). O comparativo do período de janeiro a março de 2011 com o mesmo período do ano de 2012 no Estado do Pará apontou uma redução de 63% dos casos de dengue (BRASIL, 2010e; BRASIL, 2012).

Figura 5: Incidência da dengue de acordo com o município de residência. Brasil, Janeiro a Março 2010 e 2011.



* Casos por grupos de 100 mil habitantes

Fonte: BRASIL, 2010e.

Em 2010 a confirmação de casos de VDEN-4 em RR revelou a recirculação deste sorotipo, que desde 1982 não era detectado no país (OSANAI et al., 1983; TEMPORÃO et al., 2011). Logo em seguida foram detectados casos da doença causados pelo VDEN-4 nos Estados do Amazonas e do Pará (BRASIL, 2011a, b, c). Atualmente, o VDEN-4 também foi identificado nos estados de Pernambuco (PE), BA, CE, Piauí (PI), RJ, SP, Maranhão (MA),

Rio Grande do Sul (RS) (caso importado) e Espírito Santo (ES). O VDEN-4 circula há vários anos em países da América, incluindo Peru, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Equador e Venezuela (BRASIL, 2010d, e; 2011a, b, c). No Brasil o alerta para a disseminação do VDEN-4 se justifica pelo risco de novas epidemias associadas à ocorrência de casos graves, haja vista à ausência de imunidade a esse sorotipo (BRASIL, 2010d).

3.8 IMUNOPATOGENIA

3.8.1 Imunopatogenia da Febre do Dengue

As CDs reconhecem o VDEN através de receptores de lectina-C e receptores Toll-like (RTLs). Os receptores de Lectina tipo C desempenham papel importante no estabelecimento do contato inicial entre as CDs e os linfócitos T em repouso (GEIJTENBEEK et al., 2002). As partículas virais após serem capturadas pelas CDs são endocitadas e degradadas em endossomos, e os peptídeos imunogênicos gerados são apresentados pela molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex-MHC*) classe II, também conhecido como antígenos leucocitários humanos (do inglês *Human Leucocyte Antigen- HLA*), aos linfócitos T auxiliares CD4⁺ (do inglês linfócitos T *helper*-Th) que irão produzir interferon γ (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos em resposta ao estímulo antigênico viral (LIBRATY et al., 2001; SÁNCHEZ et al., 2005; GOMES et al., 2008).

Por outro lado, as CDs em resposta à infecção secretam fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IFN- γ , bem como expressam marcadores de maturação, tais com HLA-DR, CD11 e CD83 que estimulam a sua proliferação (LIBRATY et al., 2001). Em um estudo longitudinal realizado em pacientes com FD observou-se o aumento das CDs na fase aguda da doença, o que acarretou a diminuição da gravidade da doença. As CDs que expressam molécula de adesão celular (ICAM3) podem desempenhar um papel importante no contato inicial com linfócitos T -naive|| para o VDEN (linfócito T ou B maduros que nunca entraram em contato com antígenos do VDEN), bem como na produção de citocinas pró-inflamatórias (ABBAS et al., 2008; SÁNCHEZ et al., 2005). Estudos que utilizaram inoculação via intradérmica de VDEN-2 em camundongos e macacos observaram a migração ativa de CDs da epiderme no prazo de 24h. Tal fato constatou a importância das CDs nos momentos iniciais da infecção causada pelo VDEN (SÁNCHEZ et al., 2005).

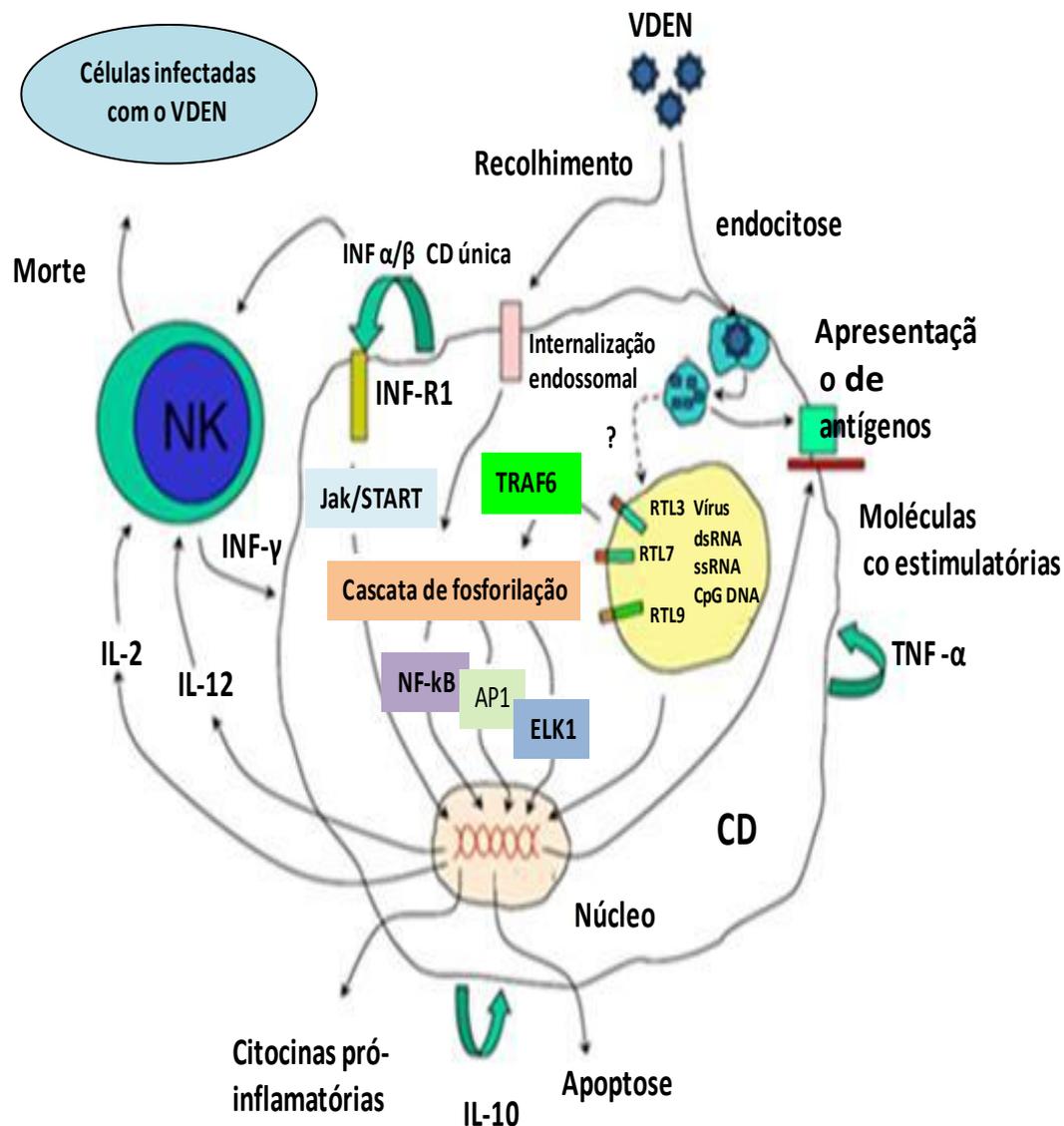
Os RTLs são proteínas citoplasmáticas, transmembrana e estão envolvidos no reconhecimento de ligantes microbianos e na expressão de diferentes genes de citocinas e/ou de moléculas coestimuladoras produzidas pelos fatores de transcrição nuclear (NF- κ B, AP1 e

ELK-1). O mecanismo de sinalização dos RTLs envolve o domínio de receptores Toll/IL-1 (RTI), e está presente em todos os RTLs e nos membros da família da interleucina 1- receptor (IL-1R) que são os responsáveis por iniciar uma cascata de sinalização via Jak/START. A ativação de membros da família IL-1R-quinase associada à família IRAK ativam domínios que levam à célula a apoptose. Uma vez fosforilada a IRAK1 e a IRAK4 dissociam-se do complexo receptor e associam-se ao TRAF6 que induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, vias de sinalização individual de RTLs são divergentes, embora o MyD88 seja comum a todas. É possível que ocorram vias dependentes e independentes de MyD88 (BELL, 2003; TAKEDA E AKIRA, 2004).

Acredita-se que moléculas de RTLs tipo 7, 8 e 9 estejam envolvidas no reconhecimento viral em endossomos (SÁNCHEZ et al., 2005). Lund e colaboradores (2004) ao utilizar camundongos com deficiência de RTL7 demonstraram que o RNA viral estimula células infectadas a produzirem IFN- α , pela via dependente de MyD88. Esse achado foi de extrema importância para as análises das interações dos RTL3 e RTL7 como componentes virais durante a interiorização endossomal (SÁNCHEZ et al., 2005).

As células *Natural Killer* (NK) constituem uma população de linfócitos T que está envolvida na imunidade inata. Macrófagos e CDs infectadas secretam IL-2 e IL-12 e IFN α/β e recrutam células NK aos órgãos e tecidos infectados pelo VDEN. As células NK expressam receptores, tais como NKp46 e o NKp30 e destroem as células infectadas, especialmente aquelas que exibem níveis reduzidos de moléculas HLA classe I, por meio de citólise direta e citotoxicidade anticorpo-dependente (Figura 6) (KURANE et al., 1986; SÁNCHEZ et al., 2005). A destruição das células infectadas pelo VDEN geralmente ocorre antes dos linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (LTCs) antígeno específicos se tornarem completamente ativos. Estudos realizados por Sánchez e colaboradores (2005) sugerem um papel potencial da ativação das células NK nos primeiros momentos da infecção primária causada pelo VDEN.

Figura 6: Hipótese da resposta imunológica inata gerada em infecções causadas pelo VDEN.



Nota: NK= célula -Natural Killer||; IL-2= interleucina 2; IL-10/ 12= interleucina 10/ 12; INF- γ / α / β = interferon gama/ alfa / beta; CD= célula dendrítica; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; VDEN= *Vírus Dengue*; INF-R1= receptor solúvel de interferon; Jak/START= proteína Janus kinase/ proteína do citoplasma START (Transdutor de sinal de transcrição ativada); TRAF6= fator associado ao receptor de necrose tumoral; NF- κ B= fator nuclear κ B; AP-1= proteína de ativação 1; ELK-3= enzima que estimula a transcrição de Fos, componente do fator de transcrição da AP-1; RTL 3/7/8= receptor Toll like 3/7/8; dsRNA= RNA fita dupla; ssRNA= RNA fita simples; CpG DNA= DNA sintético contendo sequências CpG; ?= via desconhecida.

Fonte: Adaptado de Sánchez et al., 2005.

Juffrie e colaboradores (2000) ao avaliarem crianças infectadas com VDEN observaram o aumento de IL-8 que está diretamente relacionada com a desgranulação dos neutrófilos. Análises do sangue de pacientes com FHD/SCD mostraram um aumento de neutrófilos imaturos 5-6 dias após o início dos sintomas. Esses dados indicam que neutrófilos imaturos podem facilitar a ativação do complemento, do sistema fibrinolítico e da coagulação. Butthep (1993) observou um número elevado de neutrófilos e plaquetas interagindo com células endoteliais, o que pode explicar a neutropenia e a trombocitopenia observada em pacientes com FHD/SCD.

A liberação de IFN- α parece ser crítico durante a resposta imunológica precoce e na resistência ao VDEN. Camundongos deficientes de IFN- α/β e de receptores de IFN- γ morreram após inoculação intraperitoneal de VDEN adaptado. O IFN mostrou-se um forte inibidor da replicação viral em diferentes tipos celulares que haviam sido tratados com citocinas antes da exposição ao VDEN. No entanto, tem sido observado que o IFN tem pouco efeito sobre o VDEN após o estabelecimento da replicação viral, o que sugere que o IFN não está plenamente envolvido na replicação viral, o que explicaria os elevados títulos virais associados aos altos níveis de IFN observados durante algumas infecções. Assim, o IFN- α/β desempenha um papel importante nos mecanismos de defesa das células hospedeiras contra o VDEN (SÁNCHEZ et al., 2005).

A ativação de CDs, células NK, neutrófilos juntamente com a produção de citocinas, quimiocinas e do complemento desempenham papel importante na resposta imunológica inata e no desencadeamento da resposta imunológica adaptativa que envolve a ativação de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ e linfócitos B (SÁNCHEZ et al., 2005). Na infecção primária os anticorpos produzidos pelos linfócitos B ligam-se aos epítopos da proteína E do envelope viral e promovem a lise viral por fixação do complemento. Esses anticorpos por meio de seus receptores Fc das IgG facilitam a ação citotóxica dos LTCs sobre as células infectadas com VDEN (GOMES et al., 2008). Os LTCs agredem diretamente as células infectadas com VDEN, que expressam receptores HLA tipo I, lisando-as (MONATH E TSAI, 1997). As proteínas NS1, NS3 e E estimulam a ação citotóxica dos linfócitos, restando, após a primoinfecção, uma quantidade decrescente de anticorpos subneutralizantes e a presença das células de memória (GUIMARÃES, 1999).

As citocinas observadas nas respostas celular e humoral são de extrema importância para a modulação da resposta imunológica durante as infecções causadas pelo VDEN. Essas respostas atuam de forma antagônica, o IFN- γ modula negativamente a resposta humoral, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta celular, o que permite a homeostase e o

balanceamento da resposta imunológica (MILLS E MACGUIRK, 2004). Numerosos estudos indicam que as concentrações de citocinas, de mediadores e de receptores solúveis podem estar significativamente aumentadas durante a infecção por dengue. Análises de soros de pacientes infectados com o VDEN indicam que as concentrações de IL-10, TNF- α , IL-8, IL-12, IFN- γ/α , elastase e receptores solúveis de TNF e IL-2 estão aumentados durante FD e/ou FHD (FINK E VASUDEVAN, 2006).

Chaturvedi e colaboradores (2000) observaram a mudança da resposta celular dos casos de FD para o tipo humoral em casos graves de FHD grau IV. O perfil de citocinas dos pacientes com FD foi caracterizado pelo aumento dos níveis de IFN- γ e IL-2 e ausência de IL-4, IL-6 e IL-10, uma resposta típica do tipo celular, enquanto que na FHD grau IV os pacientes apresentaram níveis elevados de IL-4, IL-6 e IL-10 e níveis diminuídos ou ausentes de IL-2 e IFN- γ , característico de uma resposta do tipo humoral.

A IL-12 tem efeito sobre a regulação de células da resposta celular, enquanto sua ausência desloca o equilíbrio no sentido da resposta humoral. Níveis elevados de IL-12 foram vistos nos pacientes com FD e ausência completa de IL-12 nos pacientes com FHD graus III e IV (PACSA et al., 2000). Assim, a IL-12 pode exercer importante papel na prevenção da FHD, mantendo a resposta do tipo celular (CHATURVEDI et al., 2000).

3.8.2 Imunopatogenia da Febre Hemorrágica do Dengue

A hipótese mais aceita sobre a patogenia da FHD foi a defendida por Halstead, conhecida como –teoria sequencial|| (HALTEAD, 1970; 1980; 1981). O princípio dessa teoria seria que anticorpos adquiridos em infecções prévias pelo VDEN, ou anticorpos maternos recebidos passivamente (em menores de um ano de idade), não teriam a capacidade de neutralizar a nova infecção por um sorotipo heterólogo, mas atuariam grandes quantidades de partículas virais para dentro das células fagocitárias o que resultaria em alterações na hemodinâmica que podem evoluir para FHD/SCD com ou sem morte (HALSTEAD, 1980; 1981).

Outra hipótese para a FHD é a desregulação da resposta imunológica do tipo transitória, expressa por superprodução de citocinas, mudanças da resposta tipo celular para resposta humoral e inversão da reação CD4⁺/CD8⁺ (CHATUVERDI et al., 2000; MUSTAFA et al., 2001; YANG, 2001; ROTHMAN, 2011). Além disso, a variação nos epítomos antigênicos do VDEN pode contribuir para modulação da resposta imunológica (HALSTEAD, 1981). Existem ainda relatos que a variação na virulência das cepas do VDEN determina a gravidade da infecção (ROSEN, 1977). Há também a hipótese que considera os

fatores de risco individuais e epidemiológicos, assim como os fatores relacionados ao vírus (Figura 1) (GUZMAN E KOURI, 2002).

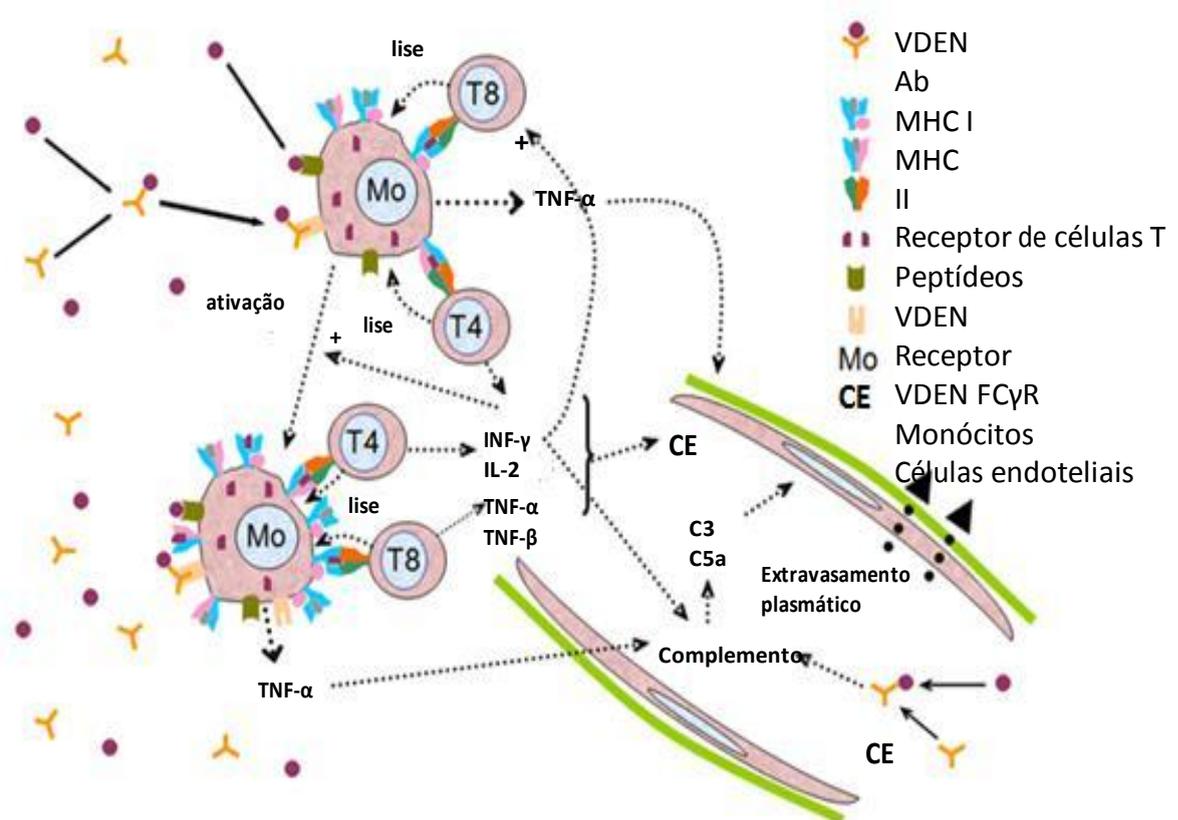
Após a infecção primária causada pelo VDEN alguns anticorpos não específicos permanecem circulando em quantidades subneutralizantes e há permanência de linfócitos de memória, que sintetizam IgG em quantidade maiores que às observadas durante a fase aguda da infecção primária (MARTINEZ, 1998). Acredita-se que anticorpos IgG subneutralizantes agiriam como carreadores do VDEN (ação subneutralizante), fixando maior quantidade de partículas de virais aos receptores Fc da membrana celular, especialmente de macrófagos e linfócitos durante a infecção secundária (HALSTEAD, 1980; SANGKAWIBHA et al., 1984; KURANE et al., 1991a). Assim, a infecção por um novo sorotipo do VDEN estimularia as células de memórias a produzirem mais anticorpos, e esses induziriam maior fixação de novas partículas virais nos receptores Fcγ de anticorpos IgG (HALSTEAD, 1980; SANGKAWIBHA et al., 1984; KURANE et al., 1991a). O complexo partícula viral e anticorpo heterólogo ocorreriam principalmente nos receptores Fc, o que resultaria no aumento da atividade fagocitária dos macrófagos e, conseqüentemente, maior replicação viral (KURANE et al., 1991b; GREEN et al., 1993).

Esse fenômeno é conhecido como imunofacilitação ou amplificação dependente de anticorpos (do inglês *antibody dependent Enhancemen-ADE*). Assim, à medida que aumenta o número de células infectadas pelo VDEN, aumenta a severidade da doença (HALSTEAD, 1980; 1981; SANGKAWIBHA et al., 1984; KURANE E ENNIS, 1997). O que explicaria o maior número de células infectadas pelo VDEN durante a infecção secundária (CHEN et al., 2001).

A expressão de HLA-1 por macrófagos hiperinfectados facilitaria o seu reconhecimento pelos linfócitos T CD8⁺, aumentando assim a atividade citotóxica das citocinas. Os linfócitos T CD4⁺, previamente sensibilizados, ao terem um segundo contato com o VDEN produzem INF-γ, os quais atuam sobre os receptores Fc, propiciando ao VDEN mais aderência aos macrófagos, potencializando assim a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺. O mesmo IFN-γ provoca aumento da concentração de HLA-1 e HLA-2 nos macrófagos, facilitando o reconhecimento e o aumento de citocinas citotóxicas (GOMES et al., 2008). Os macrófagos infectados, ao serem lisados pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, liberam: i) tromboplastina, que é a responsável pelo início do fenômeno da coagulação; ii) proteases ativadoras do complemento, que provocam a lise das células infectadas com os vírus; ii) e, macrófagos e linfócitos que liberam TNF-α, que por sua vez atuarão nas células inflamatórias e endoteliais, levando à trombocitopenia (GOMES et al., 2008). A

permeabilidade vascular é aumentada devido ao efeito combinado de histamina, radicais livres, citocinas pró-inflamatórias (principalmente a IL-8) e os produtos da via do complemento (Figura 7) (CHATURVEDI et al., 2000). Acredita-se que a IL-6 seja a responsável pela hipertermia (GOMES et al., 2008). A interação das proteínas do complemento com o IFN- α e com TNF- α pode ser um gatilho para o extravasamento plasmático observado durante a infecção secundária (SÁNCHEZ et al., 2005). A mudança nos níveis relativos da IL-12 e do Fator de Transformação do Crescimento Beta (do inglês *transforming growth factor beta*- TGF- β) desloca a resposta celular dominante para uma resposta humoral, resultando na exacerbação dos sinais e sintomas da doença que pode levar à morte (CHATURVEDI et al., 2000).

Figura 7: Imunopatogenia da Febre Hemorrágica do Dengue.



Nota: T8= linfócito T CD8+; T4= linfócito T CD4+; TNF- α / β = fator de necrose tumoral alfa/ beta; INF- γ = interferon gama; IL-2= interleucina 2; C3 = fração C3 do complemento; C5a= fração C5a do complemento.

Fonte: Adaptado de Rothman e Ennis, 1999.

3.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

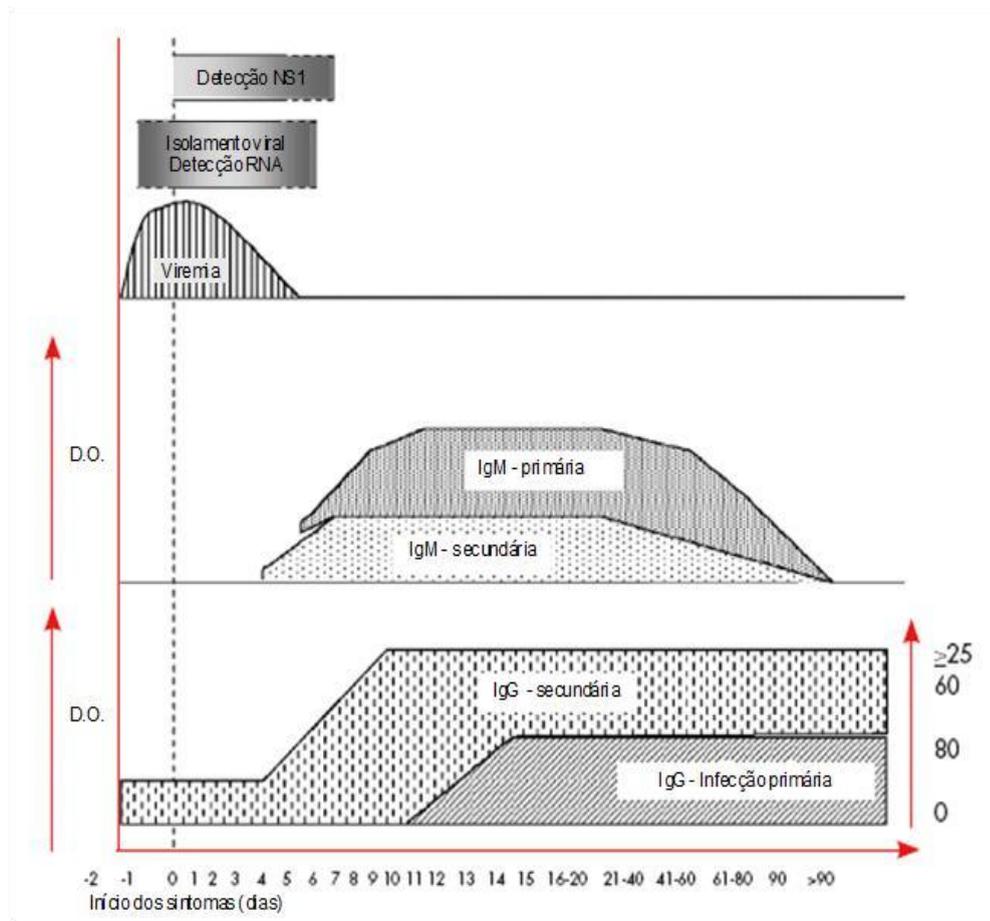
3.9.1 Específico

O diagnóstico laboratorial da dengue é comumente realizado através do isolamento do VDEN em cultivo celular, de testes sorológicos, da detecção do genoma, de antígenos virais entre outros (ROSEN E GUBLER, 1970; KUNO et al., 1985; GUBLER, 1998, FONSECA E FIGUEIREDO, 2009). O método rotineiro para tentativa de isolamento do VDEN é a inoculação do material suspeito em células de mosquitos da espécie *Ae. albopictus*, clone C6/36. O diagnóstico virológico da dengue deve ser realizado na fase aguda das infecções, durante o período virêmico, que costuma durar em média até cinco dias após o início dos sintomas (FONSECA E FIGUEIREDO, 2009). Portanto, as amostras de sangue ou soro humano deverão ser coletadas até o quinto dia após o início dos sintomas (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1994; PINHEIRO et al., 1997; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997a, b). No caso de óbito, a tentativa de isolamento viral poderá ser feita preferencialmente a partir de fragmentos do fígado, pulmões, baço, linfonodos, timo e cérebro. O cultivo celular, após a inoculação do espécime suspeito é observado diariamente durante 14 a 21 dias (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997b). Após esse período é realizada a tentativa de identificação viral através do teste de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando anticorpos monoclonais (TESH, 1979). A detecção da carga viral pode ser realizada pela transcrição reversa do seu RNA em DNA complementar, seguida de amplificação em cadeia pela polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR) (FONSECA E FIGUEIREDO, 2009).

A captura de anticorpos IgM pelo método imunoenzimático denominado MAC-ELISA (do inglês *IgM Antibody Capture Enzyme Linked Immunosorbent Assay*-MAC ELISA), é o método mais utilizado para a confirmação de casos suspeitos da dengue. A resposta de anticorpos para infecção pelo VDEN difere de acordo com o estado imunológico do indivíduo infectado (VORNDAN E KUNO, 1997). A resposta primária (indivíduo não infectado previamente por flavivírus ou não imunizado contra flaviviruses) é caracterizada por um lento aumento de IgM (BRASIL, 2009; WHO, 2009). Os anticorpos IgM são detectáveis em 50% dos pacientes após 5 dias após o início dos sintomas; alcançando picos cerca de duas semanas e, declínio a níveis não detectáveis aproximadamente em 2-3 meses após o início dos sintomas nas infecções primárias, ou até 30 dias nas secundárias. Anticorpos IgG são geralmente detectados em baixos títulos em média ao término da primeira semana de doença; depois se observa um lento aumento, permanecendo detectáveis após vários meses e provavelmente por toda a vida (INNIS et al., 1989; PAHO, 1994). Durante a infecção secundária (indivíduo previamente infectado por algum sorotipo do VDEN, ou outro

flavivírus, ou ainda que tenha sido vacinado contra alguma flavivirose), os anticorpos IgG são detectados em elevados títulos, até mesmo na fase aguda, e persistem por períodos que vão de 10 meses a vida toda (BRASIL, 2009). Os níveis de IgM, nas infecções secundárias são mais baixos quando comparados à infecção primária e podem não ser detectados em alguns casos (Figura 8) (CHANAMA et al., 2004).

Figura 8: Esquema temporal aproximado da dinâmica da viremia e anticorpos IgM-IgG em infecções primárias e secundárias pelo vírus dengue; e métodos de diagnóstico que podem ser usados para detectar a infecção.



Fonte: WHO, 2009.

A classificação da dengue baseada na dinâmica dos anticorpos totais ou anticorpos inibidores da hemaglutinação (IH) pelo teste de Inibição da Hemaglutinação (IH) considera caso de infecção primária quando são observados títulos elevados em amostras recentes, títulos detectados na primeira semana de longa duração ($\geq 1:640$ ou $\geq 1:1280$) e conversão sorológica (do negativo para o positivo com títulos \geq a quatro vezes) em amostras pareadas de soro colhidas na fase aguda e de convalescência cujos títulos sejam $\leq 1:1280$, coletadas com sete ou mais dias de intervalo. Habitualmente na infecção primária os anticorpos IH são

encontrados em torno do quinto - sexto dias após o início dos sintomas (WHO, 1997a). A infecção secundária é caracterizada pela presença dos anticorpos totais em amostras pareadas agudas recentes e convalescentes. Os títulos de anticorpos IH observados na fase convalescente podem alcançar níveis de 1:1280 ou bem mais elevados e esses títulos elevados de anticorpos IH são precocemente detectados, no segundo ou terceiro dia após o início dos sintomas (GUBLER et al., 1984). Vale ressaltar que os anticorpos IH podem reagir contra outros flavivírus (reação cruzada) (CHANAMA et al., 2004).

3.9.2. Inespecífico ou complementar

Em indivíduos com dengue os valores basais da série vermelha, detectados no eritrograma, de um modo geral encontram-se preservados (SILVA et al., 2008). O eritrograma pode sugerir anemia aguda nos casos de FHD/SCD com perda de sangue por hemorragias. O HCT é um parâmetro extremamente importante e como já citado costuma apresentar-se aumentado em pelo menos 20% dos valores normais na FHD (WHO, 1986; 1997b).

O leucograma na dengue é variável, sendo os achados mais comuns a leucopenia com neutropenia e linfopenia. A leucopenia resulta principalmente de neutropenias variáveis que se instalam precocemente. O mecanismo de neutropenia é ainda pouco esclarecido, havendo teorias que sustentam a possibilidade da ativação do complemento via esquema clássico e alternativo que poderia causar a agregação e a adesão de neutrófilos (SILVA et al., 2008). Em alguns casos a leucocitose pode ser observada, no entanto, essa é mais frequente na FHD do que na FD. Nesses casos não se observa uma resposta tipo desvio à esquerda, nem a presença de granulações atípicas, porém linfócitos atípicos são os achados mais frequentes. Nos casos graves pode ocorrer hemoconcentração, plaquetopenia (menor $100.000/\text{mm}^3$), além de hipoalbuminemia ($< 3,5 \text{ g/dl}$), alterações variadas das transaminases e das provas de coagulação (BRASIL, 2011d; ROTHMAN, 2011).

Algumas alterações podem ser observadas no coagulograma tais como queda do fibrinogênio por consumo dos fatores VIII, IX e da antitrombina III. Por outro lado, encontram-se também diminuídos os fatores de coagulação dependentes da vitamina K ou fatores V, IX e X. Ademais, encontram-se prolongados o tempo de sangria, o tempo de ativação da protrombina (TAP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) (SILVA et al., 2008).

O acometimento hepático é um quadro frequente nas infecções causadas pelo VDEN. A resposta do hospedeiro à presença do vírus leva à alteração em diferentes tecidos, visando à preservação de órgãos nobres. O fígado sofre baixa oxigenação, levando à lesão de seu parênquima. O hepatócito lesado libera transaminases, que são detectáveis no sangue periférico. É observada a elevação das escórias nitrogenadas principalmente a uréia (URE), porém não é raro ser observado valores elevados de creatinina (CREA). Nos casos de FHD/SCD os níveis das enzimas aspartato-aminotransferase (AST) e alanino-aminotransferase (ALT) se encontram aumentados especialmente a AST (SILVA, 2008).

3.10 PERFIL BIOLÓGICO DOS PRIMATAS NÃO HUMANOS (*Callithrix penicillata*)

Os PNH do gênero *Callithrix* pertencem à família *Callitrichidae* e são popularmente conhecidos como saguis (RYLANDS et al. 2000). Segundo Rylands e colaboradores (2000) esse gênero apresenta seis espécies sendo elas: *C. jaccus* (saguis de tufo branco), *C. penicillata* (saguis de tufo preto), *C. kublii* (saguis de Wrid), *C. geoffroyi* (saguis de cara branca), *C. aurita* (saguis da Serra escuro), *C. flaviceps* (saguis da Serra).

O primata da espécie *C. penicillata* (É. Geoffroy, 1812) é um pequeno PNH neotropical com ampla distribuição na natureza, que possui uma relação filogenética muito próxima com os seres homem (HEARN et al., 1978; HIRSCH et al., 2002; SHARPE et al., 2003). Os Callithriquídeos apresentam tufos de cor preta, pré-auricular longos, em forma de pincel, manchas brancas na testa, na face, na cabeça e até nas omoplatas, que são de cor preta ou marrom escuro (Figura 9). Sua coloração geral é cinza escuro com *striatum* dorsal e cauda baixa contendo anéis de pêlo branco. Em vida livre estes PNH possuem cerca de 20 cm de comprimento, pesam entre 350 e 500g, são poliândricos e possuem longevidade aproximada de 10 anos (AURICCHIO, 1995). Os calithriquídeos geralmente se alimentam de frutas, flores, brotos, insetos, pequenos vertebrados, sementes, aves, mariscos, ovos, goma e resina (lançado por algumas espécies de árvores, composta por açúcares e sais minerais) (CASTRO, 2003b; IRANDA E HIRANO, 2011).

Figura 9: Primatas não humanos da espécie *Callithrix penicillata* utilizados no estudo experimental.



Fonte: Camille Oliveira, 2012¹.

O modelo de saguis comum oferece várias vantagens sobre outros modelos na sua utilização em pesquisas. Entre as vantagens temos: o pequeno tamanho, a disponibilidade, a facilidade de manutenção e de manuseio, assim como o menor custo (OMATSU et al., 2011). Estudos experimentais que utilizam saguis da espécie *C. jacchus* são comumente relatados. Contudo, há poucos estudos disponíveis que utilizam saguis da espécie *C. penicillata* como modelo experimental (RYLANDS et al. 2000).

Imbeloni e colaboradores (2009) realizaram um estudo descritivo dos parâmetros hematológicos (84 animais) e bioquímicos (37 animais) de saguis adultos saudáveis da espécie *C. penicillata* albergados no Centro Nacional de Primatas (CENP) localizado em Ananindeua-PA e obtiveram os parâmetros hematológicos e bioquímicos descritos na tabela 1. A tabela 1 também cita aos parâmetros laboratoriais utilizados como referência de normalidade para o homem.

¹ Camille Oliveira: aluna do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Centro Universitário do Estado do Pará e Bolsista do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica do Instituto Evandro Chagas-PA.

Tabela 1: Índices hematológicos e bioquímicos utilizados como parâmetros de normalidade para primatas das espécies *Callithrix penicillata* e *Homo sapiens*.

| Parâmetros | | Espécie | |
|-------------------|--|-----------------------|---------------------|
| | | <i>C. penicillata</i> | <i>Homo sapiens</i> |
| Eritrograma | Hemácias ($\times 10^3/\text{mm}^3$) | 5,41 | 4,0-5,4 |
| | Hemoglobina (g/L) | 12,1 | 12-16 |
| | Hematócrito (%) | 39,7 | 35-46 |
| Leucograma | Leucócitos ($\times 10^9/\text{mm}^3$) | 7,500 | 4,000-11,000 |
| | Neutrófilos (%) | 45,9 | 60-65 |
| | Monócitos (%) | 1 | 4-8 |
| | Linfócitos (%) | 51,4 | 20-30 |
| Coagulograma | Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$) | 659 | 140-400 |
| | TAP (seg) | ---- | 12-15 |
| | TTPA (seg) | ---- | 30-50 |
| Bioquímica Sérica | Ureia (mg/dL) | 28,6 | 16,2-39 |
| | Creatinina (mg/dL) | 0,4 | 0,23-0,90 |
| | AST (UI/mL) | 114,24 | 5-45 |
| | ALT (UI/mL) | 38* | 5-40 |

Nota: * *Callithrix jacchus*; --- = valor não encontrado.

Fonte: Imbeloni, et al., 2009; Diniz, 1997; Fortiman et al., 2002; Zago et al., 2004; Lorenzi, 2006; Bayes e Dominiczk, 2007; Gliglior e Kolika, 2007.

Estudos realizados com calithriquídeos de 360 dias de vida nascidos e criados no CENP apresentaram peso médio de 243g. Em outro estudo foi observado longevidade ≥ 12 anos para saguis fêmeas e ≥ 6 anos para os saguis machos albergados no CENP (informações cedidas por Gilmara Abreu, 2012)².

Diversos estudos clínicos que utilizam animais como modelo experimental descrevem o papel das citocinas, seja estimulando ou inibindo o processo inflamatório, a imunidade e/ou a hematopoese. Os PNH são muito utilizados em estudos da resposta imunológica celular e humoral da hepatite A, do HIV, da leishmaniose e da malária (ABBAS et al., 2008). Atualmente, a detecção do perfil sérico de citocinas em resposta a infecção causada pelo VDEN tem sido muito documentada em camundongos. Contudo, há poucos estudos publicados que descrevem esse perfil em PNH infectados com o VDEN. O Quadro 2 descreve de forma sucinta as principais funções das citocinas empregadas nesse estudo.

² Gilmara Abreu: Tecnologista em Pesquisa e Investigação Biomédica do Centro Nacional de Primatas-CENP.

Quadro 3: Principais funções das citocinas abordadas no estudo experimental.

(continua)

| Citocinas | Produzidas por | Principais Funções | |
|--------------------------------|--|---|---|
| | | Animal | Homem |
| IL-6 | Células T e muitos outros tipos celulares. | <p>Ativas células T e células B;</p> <p>Promove a produção de IL-2 e IL-2R e a diferenciação das células T;</p> <p>Participa na maturação final das células B em plasmócitos;</p> <p>É o principal estimulador da febre na fase aguda;</p> <p>Atua como um cofator com a IL-1 na síntese de IgM e com a IL-5 na síntese de IgA.</p> | <p>Induz a síntese de proteínas na fase aguda;</p> <p>Ativa células T e a produção de IL-2;</p> <p>Estimula a produção de imunoglobulina por células B;</p> <p>Estimula o crescimento de células hematopoiéticas;</p> <p>Estimula a produção de proteínas de fase aguda por hepatócitos e age como um pirógeno;</p> <p>Induz a febre.</p> |
| TNF-α | Células T, CDs, macrófagos e mastócitos. | <p>É o mediador de muitas funções imunológicas e inflamatórias;</p> <p>Regulam o crescimento de muitos tipos celulares, principalmente macrófagos;</p> <p>Pode disparar a apoptose em algumas células tumorais e contribui para reações inflamatórias locais.</p> | <p>Antiviral, aumenta a expressão de MHC I;</p> <p>Estimula o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção;</p> <p>Estimula células endoteliais e macrófagos a secretar quimiocinas que acentuam a afinidade das integrinas leucocitárias por seus ligantes e induzem a quimiotaxia e o recrutamento de leucócitos.</p> |
| IL-2 | Células T | <p>Atua nas células T, células B e células NK;</p> <p>Age nas células B, promovendo seu crescimento e estimulando a síntese de imunoglobulina;</p> <p>Induz a produção de INF-γ e de IL-5 e regula a expressão do receptor do TNF-α.</p> | <p>Atua como um fator de crescimento, sobrevivência e diferenciação para células T;</p> <p>Tem papel principal na regulação das células T por suas ações na célula T reguladoras;</p> <p>Promove na proliferação e ativação de células NK;</p> <p>Atua na proliferação, síntese de anticorpos (<i>in vivo</i>) das células B.</p> |

(continua)

| Citocinas | Produzidas por | Principais Funções | |
|--------------------------------|-----------------------------|---|---|
| | | Animal | Homem |
| IFN-γ | Células T citotóxicas e NK. | <p>Atua nas células T, nas células B e nos macrófagos;</p> <p>Aumenta a secreção de moléculas de MHC I das células T e inibe as moléculas de MHC II;</p> <p>Induz as células da resposta humoral a produzirem IL-2 e IL-2R e inibirem a produção de IL-4;</p> <p>Potencializa as atividades das células NK que respondem a um antígeno através da produção de INF-γ;</p> <p>Promove uma fagocitose mediada por anticorpos, bem como reações de citotoxicidade medidas por células anticorpo-dependente;</p> <p>Potencializa a secreção de IL-1, IL-6 e TNF-α.</p> | <p>Protege contra infecções virais e promovem imunidade mediada por células contra microorganismos intracelulares;</p> <p>Sintetiza várias enzimas que interferem com a transcrição do RNA ou DNA viral e replicação viral;</p> <p>Acentua a apresentação de antígeno associada ao MHC e amplifica a fase de reconhecimento das respostas imunológicas mediante o aumento dos ligantes que as células T reconhecem;</p> <p>Podem aumentar a atividade citotóxica das células NK;</p> <p>Promove a diferenciação de células T CD4⁺ -naives para células típicas da resposta inata e inibe a proliferação de células características da resposta humoral.</p> |
| IL-4 | Células T e mastócitos. | <p>Ativa células T, células B, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos;</p> <p>Potencializa o desenvolvimento de células T citotóxicas a partir de células T em repouso;</p> <p>Estimula o crescimento e diferenciação de células B;</p> <p>Promove a diminuição da secreção de IL-1, IL-6 e TNF-α.</p> | <p>Estimulação de IgE;</p> <p>Estimula o desenvolvimento de células da resposta humoral e células T CD4⁺ naives;</p> <p>Inibe o desenvolvimento das células da resposta inata;</p> <p>Juntamente com a IL-13, contribui para uma forma alternativa de ativação dos macrófagos que é distinta da resposta dos macrófagos ao IFN-γ;</p> <p>É neutralizada pelo INF-γ.</p> |

(conclusão)

| Citocinas | Produzidas por | Principais Funções | |
|-------------|------------------------|--|---|
| | | Animal | Homem |
| IL-5 | Células T e mastócitos | Potencializa a produção de células B; Aumenta a síntese de IgE pela IL-4; Induz a atividade das células T citotóxicas. | Estimula o crescimento de células B e a secreção de Ig; É fator de crescimento e diferenciação para eosinófilos. |

Fonte: Benjamini et al., 2002; Abbas et al., 2008; Tizard, 2009; Murphy, 2010.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver estudo experimental em PNH da espécie *Callithrix penicillata* mediante infecção sequencial do VDEN-3 e do VDEN-2.

4.1.1 Objetivos específicos

- Investigar as características clínicas das infecções causadas pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2 nos saguis infectados;
- Quantificar a resposta imunológica de anticorpos IgM e inibidores da hemaglutinação (IH) ou anticorpos totais (IgM e IgG) nas infecções primária pelo VDEN-3 e secundária pelo VDEN-2 nos calithriquídeos infectados;
- Mensurar os parâmetros hematológicos e bioquímicos nas infecções primária pelo VDEN-3 e secundária pelo VDEN-2 nos animais infectados;
- Descrever o perfil serico das citocinas IL-6, TNF- α , IL-2, INF- γ , IL-4, IL-5 (pró inflamatórias e reguladoras) nas infecções primária pelo VDEN-3 e secundária pelo VDEN-2 nos PNH infectados.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi classificado como um estudo experimental, descritivo, analítico e controlado e, a amostragem foi selecionada por conveniência. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do IEC (registro nº 0061/2009) (Anexo A) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade- SISBIO do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade- ICMBio (registro nº 22047-1) (Anexo B) e contou com recursos financeiros do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) para Febres Hemorrágicas Virais (processo nº 573739/2008-0) do CNPq/FAPESPA/CAPES e do IEC.

Os procedimentos foram realizados no CENP, no IEC e no Centro de Pesquisa René Rachou da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) localizado em Belo Horizonte- Minas Gerais (MG) seguindo as normas e os critérios pré-estabelecidos pelo Comitê Internacional de Biossegurança e pelos manuais -Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia|| (BRASIL, 2001) e -Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos|| (BRASIL, 2010f).

5.1 AMOSTRAS VIRAIS

Foram utilizadas nesse estudo duas amostras virais: uma do sorotipo do VDEN-2 e outra do VDEN-3, ambas obtidas de casos de óbito classificados segundo o MS como FHD/SCD. Essas amostras foram identificadas e caracterizadas geneticamente na Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do IEC (SAARB/IEC) (Quadro 4).

Quadro 4: Amostras virais de VDEN de casos de óbitos utilizadas nos PNH da espécie *Callithrix penicillata* durante o estudo experimental.

| Registro | Data do isolamento | Procedência | Espécimes de isolamento | Caracterização Molecular |
|-----------------|---------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| H 744248 | 04/03/2008 | Natal- RN | Linfonodo | VDEN-2 |
| H 712149 | 11/08/2006 | Natal- RN | Fígado | VDEN-3 |

Fonte: SAARB-IEC

5.2 PROPAGAÇÃO DO VDEN PARA PRODUÇÃO DE ESTOQUE VIRAL

Para a propagação da amostra do VDEN-2 e do VDEN-3 foi utilizado à linhagem celular contínua de mosquito *Aedes albopictus* (clone C6/36) (IGARASHI, 1978). Para isso, duas suspensões virais (uma do VDEN-2 e outra do VDEN-3) foram preparadas a partir da maceração dos fragmentos de linfonodos e de fígado dos casos de FHD/SCD selecionados (passagem # 1) para re-isolamento viral. Os fragmentos foram diluídos na proporção de 1:10 em PBS, pH 7,4, contendo 0,75 % de albumina bovina e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Em seguida, foram centrifugados a 5.000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos, à 4 °C. Os sobrenadantes dessas suspensões virais foram inoculados em diferentes garrafas de 75 cm² que continham uma monocamada confluyente de células. O meio de cultivo utilizado foi o Leibowitz modificado com L- Glutamina (L-15), acrescido de triptose, aminoácidos não essenciais, penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL), 5% de soro bovino fetal (SBF) para meio de crescimento e 2% para meio de manutenção. As garrafas foram verificadas diariamente até a observação de possível efeito citopático (ECP). Quando as culturas exibiram ECP em 75% das células, os sobrenadantes dos cultivos de células C6/36 infectadas foram coletados, aliqüotados e armazenados em freezer à -70 °C com 5% de SBF, até o uso. Para confirmar a presença do VDEN-3 e do VDEN-2 nas células infectadas realizou-se o teste de IFI utilizando anticorpos monoclonais, segundo técnica descrita por Gubler e colaboradores (1984).

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO

Foram incluídos, nesse estudo, PNH procedentes da colônia de *C. penicillata* do CENP, que:

- Não se encontravam acasalados sendo considerados excedentes do plantel;
- Apresentaram resultados negativos para a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação pela técnica de IH contra 23 tipos de arbovírus (VDEN-1, 2, 3, 4; *Vírus da Encefalite Equina Leste*- VEEE; *Vírus da Encefalite Equina Oeste*- VWEE; *Vírus Mayo*- VMAY; *Vírus Mucambo*- VMUC; *Vírus Guaroa*- VGUA; *Vírus da Febre Amarela*- VFA; *Vírus Rocio*- VROC; *Vírus Ilhéus*- VILH; *Vírus da Encefalite de Saint Louis*- VSLE; *Vírus Tacaiuma*- VTAC; *Vírus Maguari*- VMAG; *Vírus Caraparí*- VCAR; *Vírus Oropouche*- VORO; *Vírus Catú*- VCAT; *Vírus Icoaraci*- VICO; *Vírus Utinga*- VUTI; *Vírus Cacipacore*- VCPC; *Vírus Bussuquara*- VBSQ; *Vírus Belém*-VBLM (CLARKE E CASAL, 1958; SHOPE, 1963).
- Tinham idade compreendida entre 1 a 10 anos.

5.4 PARÂMETROS DE NORMALIDADE

Para a aquisição de um parâmetro de normalidade antes da infecção com VDEN-3 (dia 0) e com o VDEN-2 (dia 60) os animais foram pesados (balança Micheletti-Mic Baby) e sangrados, pela via femural, para a obtenção de sangue, soro e plasma.

5.5 INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

Após atenderem os critérios do item 5.3 e por randomização através do programa BioEstat 5.0, vinte e dois saguis foram selecionados para serem utilizados nesse estudo (AYRES et al., 2007). Após a seleção, os 22 animais foram infectados com o VDEN-3 e, posteriormente, foram divididos por sorteio (número do chip) em dois grupos: a) Infecção primária: constituído por 11 animais (4 fêmeas e 7 machos, idade média de 4 anos e 3 meses) infectados somente com o VDEN-3; b) Infecção secundária: constituído por 11 animais (3 fêmeas e 8 machos, idade média de 4 anos) previamente infectados com o VDEN-3 e sequencialmente após dois meses infectados com o VDEN-2.

5.5.1 Inoculação das amostras virais

Os animais foram infectados pela via subcutânea na altura do 3^o espaço intercostal direito, com uma dose de 0,5 mL do sobrenadante de cultivo de células C6/36 infectadas com as amostras do VDEN-3 (dose infectante: $3,23 \times 10^3$ PFU/mL) e, do VDEN-2 (dose infectante: $4,47 \times 10^4$ PFU/mL). Os valores das doses infectantes foram calculados segundo Malewicz e Jenkin (1979). Os PNH infectados com o VDEN-3 e com o VDEN-2 foram mantidos em gaiolas individuais em um galpão de quarentena no CENP, onde foram observados diariamente no período de julho a outubro de 2010.

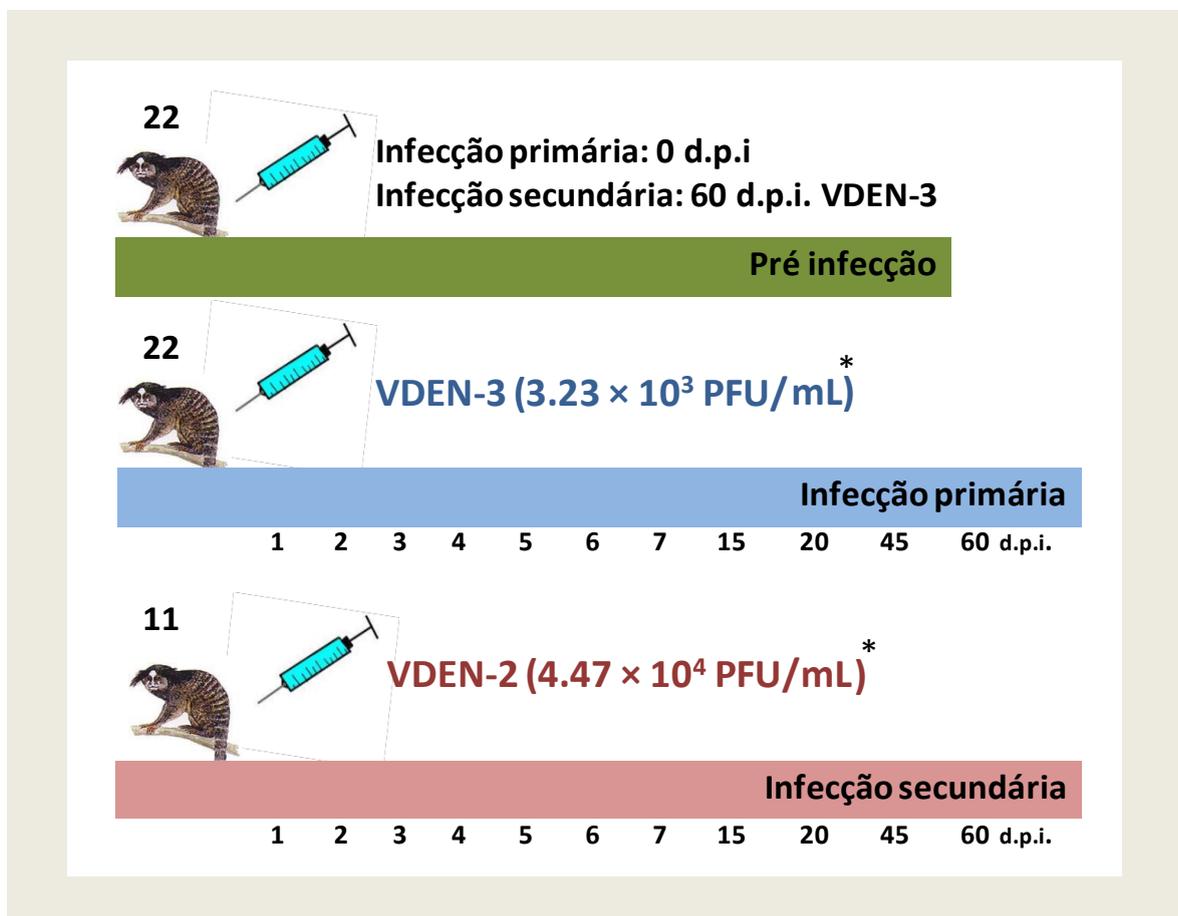
5.5.2 Coleta e armazenamento de espécimes biológicos

Diariamente, durante sete dias e em tempos de 15, 20, 45 e 60 dias após a infecção (d.p.i.), um animal dos vinte e dois inoculados com o sobrenadante do cultivo de células C6/36 infectados com VDEN-3 foi anestesiado via intramuscular com 0,2 mL de Zoletil 100 – Virbac e, posteriormente, sangrado por punção cardíaca para a obtenção de sangue total (para o hemograma), plasma e soro (para as dosagens de anticorpos IgM e IH, de marcadores bioquímicos, citocínicos e coagulograma). As amostras, sempre que possível, foram coletadas em duplicata, uma preservada em freezer a -20 °C (amostras para dosagem de anticorpos) e outra a -70 °C (amostras para dosagem de citocinas). Após a coleta das amostras todos os

animais foram sacrificados e as carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos reforçados para evitar vazamento, congelados à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente incineradas.

Após dois meses onze animais previamente infectados com VDEN-3 (infecção primária) foram infectados por via subcutânea com o sobrenadante do cultivo de células C6/36 infectadas com VDEN-2 (infecção secundária). Diariamente, durante sete dias e em tempos de 15, 20, 45 e 60 d.p.i., um animal infectado foi anestesiado, sangrado (para a obtenção de sangue total, soro e plasma) e as amostras obtidas foram identificadas e armazenadas conforme descrito anteriormente. (Figura 10).

Figura 10: Desenho do estudo experimental com PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente com o VDEN-3 e com o VDEN-2.



Nota: * Dose infectante; d.p.i.= dias após a infecção.

5.6 ESTUDOS SOROLÓGICOS

5.6.1 Captura de IgM pelo teste de MAC-ELISA

A identificação da infecção recente para o VDEN foi realizada pela captura de IgM, pelo método de MAC-ELISA, conforme descrito por Kuno e colaboradores (1987). Este método consiste na captura do anticorpo IgM quando este estiver presente nos soros ou plasmas investigados, ou seja, caso exista anticorpos IgM anti-VDEN nos soros dos animais infectados experimentalmente. Nesse caso, o antígeno do VDEN se ligará ao anticorpo formando o complexo antígeno-anticorpo. Quando presente, tal complexo é revelado por um conjugado anti-flavivírus (anticorpo anti-flavivírus ligado à enzima peroxidase) que em contato com o substrato (Sistema ABTS) gera um produto colorido.

Para a execução do teste de MAC-ELISA a placa foi previamente lavada 5 vezes com PBS pH 7,4. Para a etapa de sensibilização, foram acrescentados 100 µL de IgM anti-monkey diluída a 1:500 em tampão carbonato pH 9,6 e a placa foi incubada a 4°C, por 12 horas. Ao decorrer desse tempo, a placa foi novamente lavada 5 vezes com PBS pH 7,4. Para o bloqueio, adicionou-se 150 µL de albumina bovina a 4% em PBS pH 7,4, incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente (T.A.), em câmara úmida, seguida de lavagem da placa 5 vezes com PBS pH 7,4. Posteriormente adicionou-se 50 µL do plasma dos PNH infectados e plasmas controles (positivos para o VDEN-1, o VDEN-2, o VDEN-3 e o VDEN-4 e negativos), previamente diluídos 1:40 em albumina bovina a 0,5% em PBS pH 7,4. Incubou-se por 1 hora à 37°C em câmara úmida e em seguida a placa foi lavada 5 vezes com PBS pH 7,4. Acrescentou-se 50 µL do antígeno sucrose-acetona dos quatro sorotipos do VDEN-produzidos conforme Lenette, 1995 e na diluição ótima (1:8 para o VDEN-1, 1:15 para o VDEN-2, 1:20 para o VDEN-3 e 1:15 para o VDEN-4) em PBS pH 7,4 com 20% de soro equino normal (SEN). Incubou-se por 12 horas à 4° C em câmara úmida e, após esse tempo, lavou-se a placa 5 vezes com PBS pH 7,4 e adicionou-se 25µL do conjugado anti-flavivírus na diluição ótima (1:2000) em PBS pH 7,4 com 20% SEN. Após incubação de 1 hora à 37°C em câmara úmida, lavou-se a placa 10 vezes com PBS pH 7,4 e adicionou-se 100µL de substrato ABTS (Kirkegaard & Perry Laboratórios Inc), constituído da mistura 1:1 de solução A (azinodiethylbenzthiazoline sulfonate) e solução B (solução de peroxidase em uma concentração de 0,02 % de H₂O₂), tendo-se incubado 1 hora a 37°C. A leitura do teste foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 405 nm, previamente zerado contra um controle negativo.

5.6.2 Detecção de anticorpos totais pelo teste de inibição da hemaglutinação (IH)

O teste de IH fundamenta-se na inibição da capacidade de hemaglutinação do VDEN, quando este reage com o anticorpo específico (CLARKE E CASALS, 1958). O teste de IH foi utilizado para detectar anticorpos totais (IgM ou IgG) ou inibidores da hemaglutinação (IH) nas amostras de soro dos PNH infectados sequencialmente com o VDEN-3 e com o VDEN-2 obtidas durante o estudo experimental.

A técnica de IH foi realizada em duas etapas: triagem e titulação, conforme descrito por Clarke e Casal (1958) e adaptada para microplacas por Shope (1963). Os soros antes de serem utilizados foram tratados para remoção de inibidores naturais não específicos que poderiam interferir na hemaglutinação das hemácias. Para este fim, em tubos de vidro de 13/100 previamente identificados, foram adicionados 50 µL dos soros colhidos dos PNH infectados. Em seguida, foram acrescentados 0,45 mL de NaCl a 0,85% e 6 mL de acetona a 100% a 4 °C, agitou-se e se deixou em repouso a 4 °C por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 1 minuto, em seguida desprezou-se o sobrenadante. A acetona (6 mL a 100%) foi recolocada e incubou-se a 4 °C por 1 hora. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e colocou-se para secar em uma bomba de vácuo por 1 hora. As amostras foram hidratadas com 0,5 mL de solução borato salina pH 9,0; foi adicionados 0,6 mL de suspensão de hemácias de ganso, diluída 1:6 em albumina bovina 0,4% em pH 9,0 e as placas foram incubadas a 4 °C por 20 minutos, seguido de centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de vidro, estando este com diluição final de 1:20 e pronto para o uso no teste de IH.

Na etapa de triagem os soros tratados foram testados para verificar a presença de anticorpos IH para os seguintes vírus do gênero *Flavivirus*: VFA, VDEN-1, 2, 3 e 4, VESL, VILH e VROC, os quais são considerados os mais relevantes flavivírus circulantes no Brasil e que podem infectar humanos. Esses dados foram utilizados na análise da ocorrência de reação cruzada entre esses vírus. Os soros que apresentaram reação positiva na triagem foram titulados para a obtenção do título final (*and point*). Na etapa de titulação as amostras foram processadas da seguinte forma: adicionou-se 25 µL do soro tratado no 1^o orifício da microplaca de poliestireno; foi acrescido 25 µL de albumina bovina 0,4% em pH 9,0, do 1^o ao último orifício da microplaca; foi transferido, com o auxílio de uma micropipeta multicanal, 25 µL do 1^o ao último orifício da microplaca; foi adicionado 25 µL em todos os orifícios dos antígenos dos flavivírus mencionados acima preparados pelo método de sucrose-acetona, segundo Lenette (1995). O teste foi revelado com a adição de 50 µL de uma solução de

hemácias de ganso (diluída 1:5 em solução de Dextrose, Gelatina, Veronal- DGV) diluída em pH ótimo (pH 6,4 para o VFA, o VDEN 1, 2, 3, o VILH e o VROC e pH 6,8 para o VESL e o VDEN-4). A microplaca foi agitada e incubada a 37 °C por 30 minutos. A leitura do teste foi realizada a partir da observação visual da sedimentação ou não das hemácias de ganso; uma vez presentes nos soros, os anticorpos específicos inibiram a atividade hemaglutinante dos vírus ocorrendo sedimentação das hemácias nas placas.

5.7 ESTUDOS HEMATOLÓGICOS

O hemograma foi realizado utilizando 2 mL de sangue total colhido com anticoagulante (Ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) dos PNH durante o estudo experimental. Após a coleta, as amostras sanguíneas foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Análise Clínicas do CENP e analisadas no aparelho hematológico MS4+ de uso humano e veterinário. A cada ensaio foi realizado a avaliação dos seguintes parâmetros: contagem de eritrócitos (do inglês *Red blood Cells*-RBC), dosagem a hemoglobina (HGB), determinação do hematócrito (HCT), contagem de leucócitos (do inglês *White Blood Cells*-WBC), de neutrófilos (NE), de monócitos (MO), de linfócitos (LI) e de plaquetas (PLT).

Para realização e avaliação do coagulograma foram coletados plasmas com citrato dos PNH infectados com o VDEN-3 e com o VDEN-2 durante a cinética do experimento. Essas amostras foram enviadas à Seção de Patologia (SAPAT) do IEC onde foram processadas em kits de reagentes de TAP e de TTPA (CLOT). A leitura do teste foi realizada no coagulômetro (CLOT timer-laser sensor), conforme descrito pelo fabricante.

5.8 ESTUDOS BIOQUÍMICOS

As análises da função renal e da função hepática foram obtidas a partir da dosagem da uréia (URE) e da creatinina (CREA) e das enzimas AST e ALT, respectivamente nos soros dos PNH incluídos nesse estudo. Para realização dos testes foram empregados kits comerciais (ROCHE- São Paulo) e o analisador bioquímico (COBAS MIRA PLUS 400- São Paulo), seguindo o protocolo do fabricante.

5.9 ESTUDOS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Para a dosagem das citocinas IL-6, TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-5 foram utilizados os soros coletados dos PNH durante o estudo experimental. Para tal, utilizou-se o sistema -Cytometric Bead Array|| (CBA) (BD, Pharmingen, EUA) que emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discreta, distinta e recobertas com anticorpos específicos para o analito de interesse.

A técnica foi realizada da seguinte forma: foram feitas alíquotas de 25 μ L dos soros dos PNH infectados sequencialmente com o VDEN-3 e o VDEN-2 sem diluição prévia. Esses soros foram centrifugados por 10 minutos, a 14.000 rpm e se retirou o sobrenadante. Alíquotas dos padrões de citocinas foram submetidas à diluição seriada com diluente G (solução diluente tamponada), -Padrão sem diluição|| - 500 pg/mL, 1:2 - 2500 pg/mL; 1:4- 1250 pg/mL; 1:8- 625 pg/mL; 1:16- 312,5 pg/mL; 1:32- 156 pg/ mL; 1:64- 80 pg/mL; 1:128- 40 pg/mL e 1:256- 20 pg/mL e 25 μ L de diluente G apenas no controle negativo. O sobrenadante das amostras de soro dos PNH e os padrões do kit foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL. Em seguida, se adicionou a esses tubos 15 μ L da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas IL-6, TNF- γ , IL-2, IFN- α , IL-4 e IL-5 (Monkey Inflammation Kit, BD, Pharmingen, EUA) e 18 μ L da mistura de anticorpos monoclonais anti-citocinas, conjugados com ficoeritrina- PE (reagente B). Incubou-se por 3 horas, a T.A. e ao abrigo da luz. Ao passar esse tempo, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L da solução F (tampão de fosfato salínico) e centrifugadas a 340 g, por 7 minutos a 18 ^oC. O sobrenadante foi cuidadosamente decantado e a leitura do teste foi realizada em citômetro de fluxo (FACcalibur, BD, EUA). Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa dos analitos uma curva padrão foi construída, baseada nos dados dos padrões de citocinas em concentrações de 20 pg/mL a 5.000 pg/mL. Um modelo de ajustamento, por meio da construção da curva do 4^o parâmetro logístico permitiu o ajuste da melhor curva não linear para os dados detectados (SILVEIRA, 2011). Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidade de fluorescência de amostras fora dos limites da curva padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram armazenados em planilhas eletrônicas do programa EXCEL 2007, e as análises dos dois grupos: a) infecção primária: PNH infectados com o VDEN-3, e b) infecção secundária: PNH infectados com o VDEN-3 e sequencialmente com o VDEN-2 foram realizadas pelo programa GraphPad Prism. Os resultados foram apresentados em forma de gráficos de linha e de barras e foram representativos de amostras individuais dos PNH infectados com o VDEN3 e o VDEN2 coletadas em dias pré estabelecidos durante o estudo experimental. Dessa forma, não foi possível a disposição da média a partir de dados combinados e o emprego de testes estatísticos, sendo esse estudo apenas uma descrição dos eventos observados.

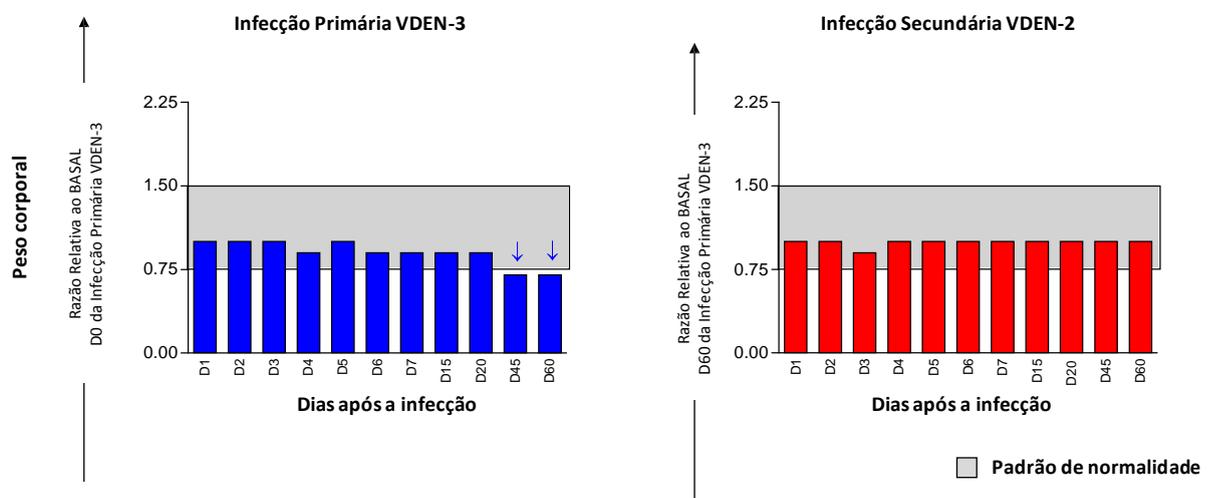
A cinética viral e a dosagem de anticorpos IgM e IH foram descritas de forma quantitativa. Os parâmetros hematológicos, bioquímicos, perfil sérico das citocinas e peso foram analisadas pela razão obtida da divisão dos valores dos parâmetros alcançados após a infecção pelos valores dos parâmetros alcançados pré infecção. Os dados utilizados na infecção primária foram alcançados pela razão obtida da divisão dos valores dos parâmetros alcançados após a infecção pelo VDEN-3 pelos valores dos parâmetros alcançados pré infecção dia zero (D0). Os dados empregados na infecção secundária foram gerados pela razão obtida da divisão dos valores dos parâmetros alcançados após a infecção pelo VDEN-2 pelos valores dos parâmetros alcançados pré infecção VDEN-2, ou seja, sessenta dias (D60) após a infecção pelo VDEN-3, conforme descrito na figura 10. Foram considerados normais todos os valores que se encontraram entre o intervalo de significância de 0,75 a 1,5, ou seja, os valores dos parâmetros quando $< 0,75$ foram considerados abaixo da normalidade e quando $> 1,5$ foram considerados acima da normalidade.

6 RESULTADOS

6.1 ALTERAÇÕES CLÍNICAS

Os PNH infectados experimentalmente com o VDEN-3 (infecção primária) apresentaram apatia, vômito, pêlos arrepiados e perda de peso (45^o e 60^o d.p.i.), conforme a figura 11. Não foi observada nenhuma alteração clínica nos animais durante a infecção secundária (VDEN-2).

Figura 11: Avaliação do peso corporal dos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2.

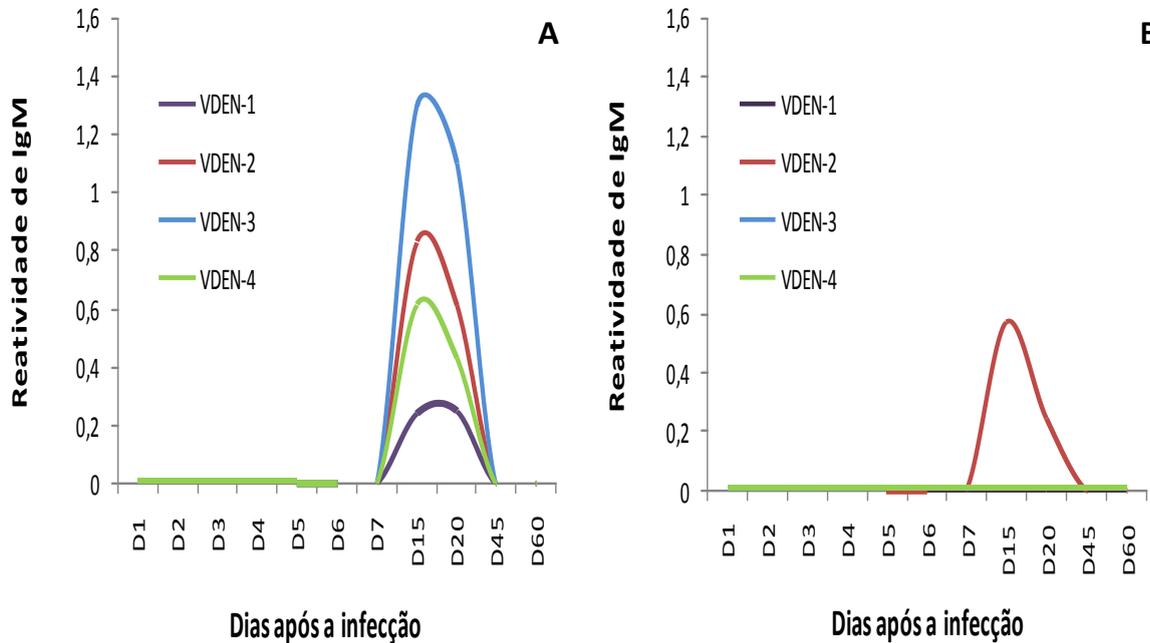


6.2 ESTUDOS SOROLÓGICOS

6.2.1 Captura de IgM pelo teste de MAC-ELISA

A captura de anticorpos IgM anti-VDEN-3 e anti-VDEN-2 foi realizada pelo teste de MAC-ELISA nos soros dos PNH infectados experimentalmente com o VDEN-3 e com o VDEN-2. Os anticorpos IgM foram detectados no 15^o e no 20^o d.p.i. pelo VDEN-3 (infecção primária) e no 15^o e no 20^o d.p.i. pelo VDEN-2 (infecção secundária). Na infecção primária o maior valor de densidade ótica (D.O.) observado para anticorpos IgM anti-VDEN-3 ocorreu no 15^o d.p.i (D.O.= 1, 297), também foi observado reação cruzada para os demais sorotipos do VDEN (os maiores valores de D.O para os anticorpos IgM: foram 0, 830 anti VDEN-2 e 0,25 anti-VDEN-4, ambos no 15^o d.p.i. e 0, 250 anti-VDEN-1 no 20^o d.p.i. (Figura 12A). Na infecção secundária foi detectado apenas anticorpos IgM anti-VDEN-2 (resposta monotípica) (maior valor de D.O.= 0, 572 no 15^o d.p.i.) (Figura 12B).

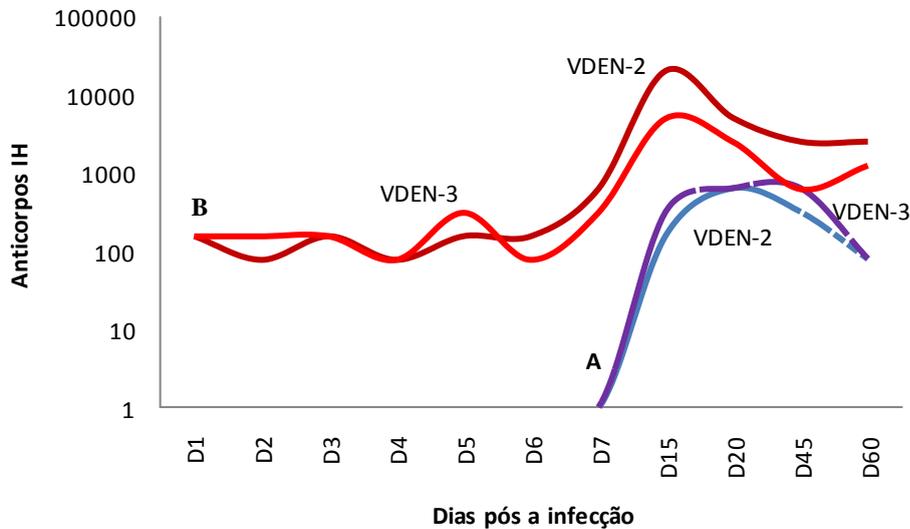
Figura 12: Detecção de anticorpos nos IgM nos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2. A) Infecção Primária (VDEN-3); B) Infecção Secundária (VDEN-2).



6.2.2 Detecção de anticorpos totais pelo teste de inibição da hemaglutinação (IH)

A detecção de anticorpos IH anti-VDEN-3 e anti-VDEN-2 foi realizada pelo teste de IH nos soros dos PNH coletados durante o estudo experimental. Anticorpos IH foram detectados do 15^o ao 60^o d.p.i pelo VDEN-3 (infecção primária) e do 1^o ao 60^o d.p.i. pelo VDEN-2 (infecção secundária). Na infecção primária os títulos de anticorpos IH variaram de 1:320 a 1:640 para o VDEN-3, bem como foi observado reação cruzada para VDEN-2 com títulos variando de 1:80 a 1:640. Na infecção secundária os títulos de anticorpos IH variaram de 1:80 a 1:20480 para o VDEN-2 e foi observada reação cruzada para o VDEN-3 com títulos que variaram de 1:80 a 1:5120 (Figura 13).

Figura 13: Detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IgM e IgG) nos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2.



Nota: A = infecção primária (VDEN-3) (azul); B = infecção secundária (VDEN-2) (vermelho).

O teste de IH também permitiu a avaliação da ocorrência de reação cruzada entre os anticorpos dos demais vírus do gênero *Flavivirus* (VFA, VDEN-1, VDEN-4, VESL, VILH e VROC) selecionados para o estudo nos soros dos saguis infectados com o VDEN-3 e com o VDEN-2. Os anticorpos IH nos soros dos PNH investigados foram detectados do 15^o ao 60^o d.p.i pelo VDEN-3 (infecção primária) e do 1^o ao 60^o d.p.i. pelo VDEN-2 (infecção secundária), conforme observado na tabela 2.

Tabela 2: Detecção de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IgM e IgG) para os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* nos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2.

| Flavivirus | Infecção primária (VDEN-3) | Infecção secundária (VDEN-2) |
|------------|----------------------------|------------------------------|
| VDEN-1 | 1:80 - 1:640 | 1:80 - 1:10240 |
| VDEN-2 | 1:80 - 1:640 | 1:80 - 1:20480 |
| VDEN-3 | 1:80 - 1:640 | 1:80 - 1:5120 |
| VDEN-4 | 1:160 - 1:640 | 1:160 - 10240 |
| VFA | 1:40 - 1:160 | 1:20 - 1:320 |
| VILH | 1:160 - 1:320 | 1:320 - 1:10240 |
| VROC | 1:40 - 1:80 | 1:20 - 1:5120 |
| VSLE | 1:80 - 1:160 | 1:80 - 10240 |

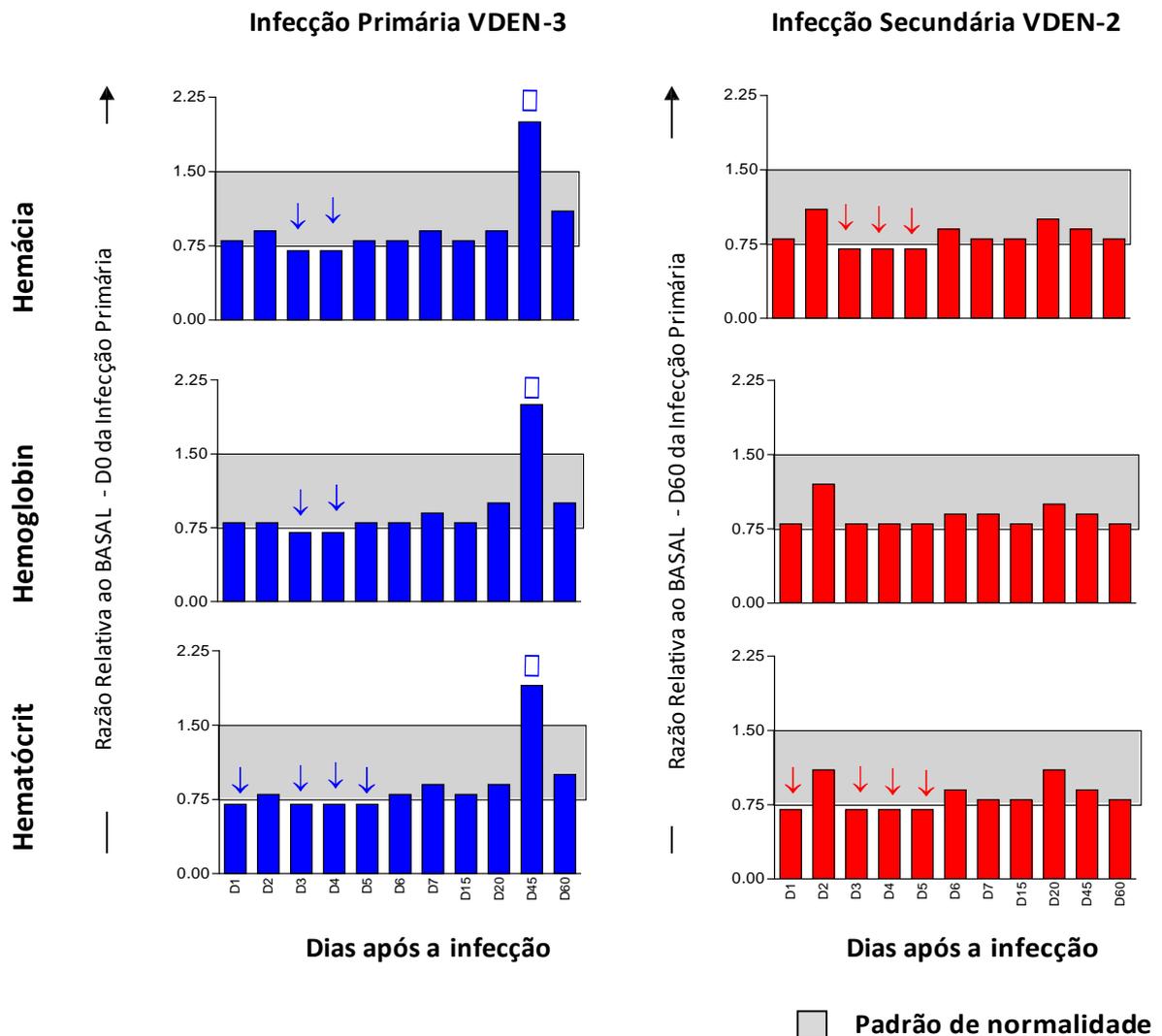
Nota: VDEN-1, 2, 3 e 4= *Vírus Dengue* 1, 2, 3 e 4; VFA= *Vírus da febre amarela*; VILH= *Vírus Ilhéus*; VROC= *Vírus Rocio*; VESL= *Vírus da Encefalite Saint Louis*.

6.3 ESTUDOS HEMATOLÓGICOS

6.3.1 Eritrograma

Na infecção primária observou-se a diminuição do número de RBC (3^0 e 4^0 d.p.i.), de HGB (3^0 e 4^0 d.p.i.) e HCT (1^0 , 3^0 , 4^0 , 5^0 d.p.i.), com elevação dos mesmos no 45^0 d.p.i. Na infecção secundária foi observado apenas a diminuição do número de RBC (3^0 , 4^0 e 5^0 d.p.i.) e do HCT (1^0 , 3^0 , 4^0 , 5^0 d.p.i.), semelhante ao observado durante a infecção primária. Não foi detectado nenhuma alteração nos níveis de HGB durante a infecção secundária (Figura 14).

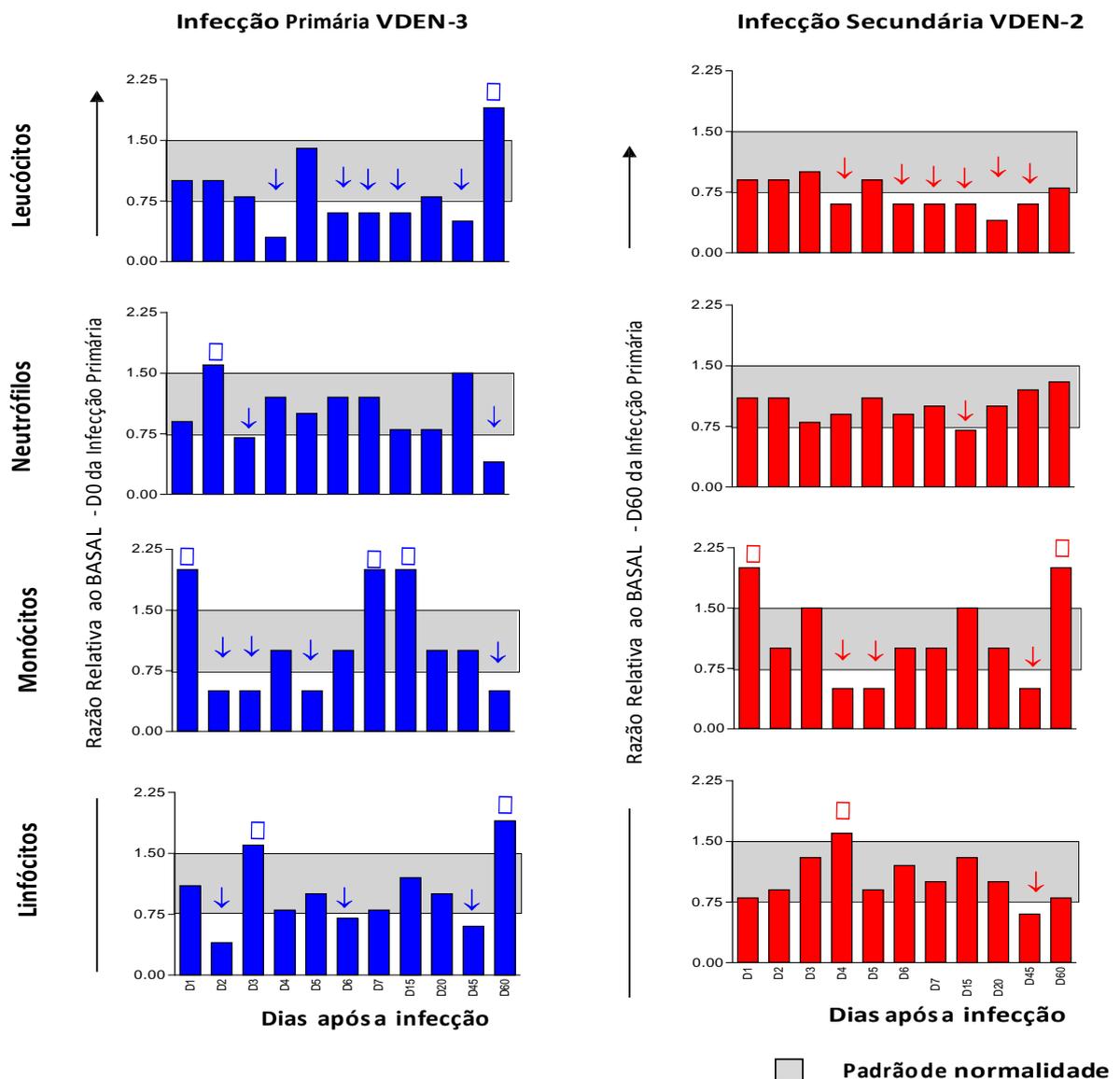
Figura 14: Avaliação do eritrograma dos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2.



6.3.2 Leucograma

Durante a infecção primária foi observado a diminuição do número de WBC (4^0 , 6^0 , 7^0 , 15^0 e 45^0 d.p.i.) e aumento no 60^0 d.p.i., diminuição do número de NE (3^0 e 60^0 d.p.i.) e aumento no 2^0 d.p.i., diminuição do número de MO (2^0 , 3^0 , 5^0 e 60^0 d.p.i.) e elevação no 1^0 , 7^0 e 15^0 d.p.i. e diminuição do número de LI (2^0 , 6^0 e 45^0 d.p.i.) com aumento no 3^0 e 60^0 d.p.i.. Na infecção secundária foi observado a diminuição do número de WBC (4^0 e do 6^0 ao 45^0 d.p.i.), de NE (15^0 d.p.i.), assim como do número de MO (4^0 , 5^0 , 45^0 d.p.i.) com elevação deste último no 1^0 e no 60^0 d.p.i.). Ainda foi detectado aumento (4^0 d.p.i.) e diminuição (45^0 d.p.i.) do número de LI, respectivamente (Figura 15).

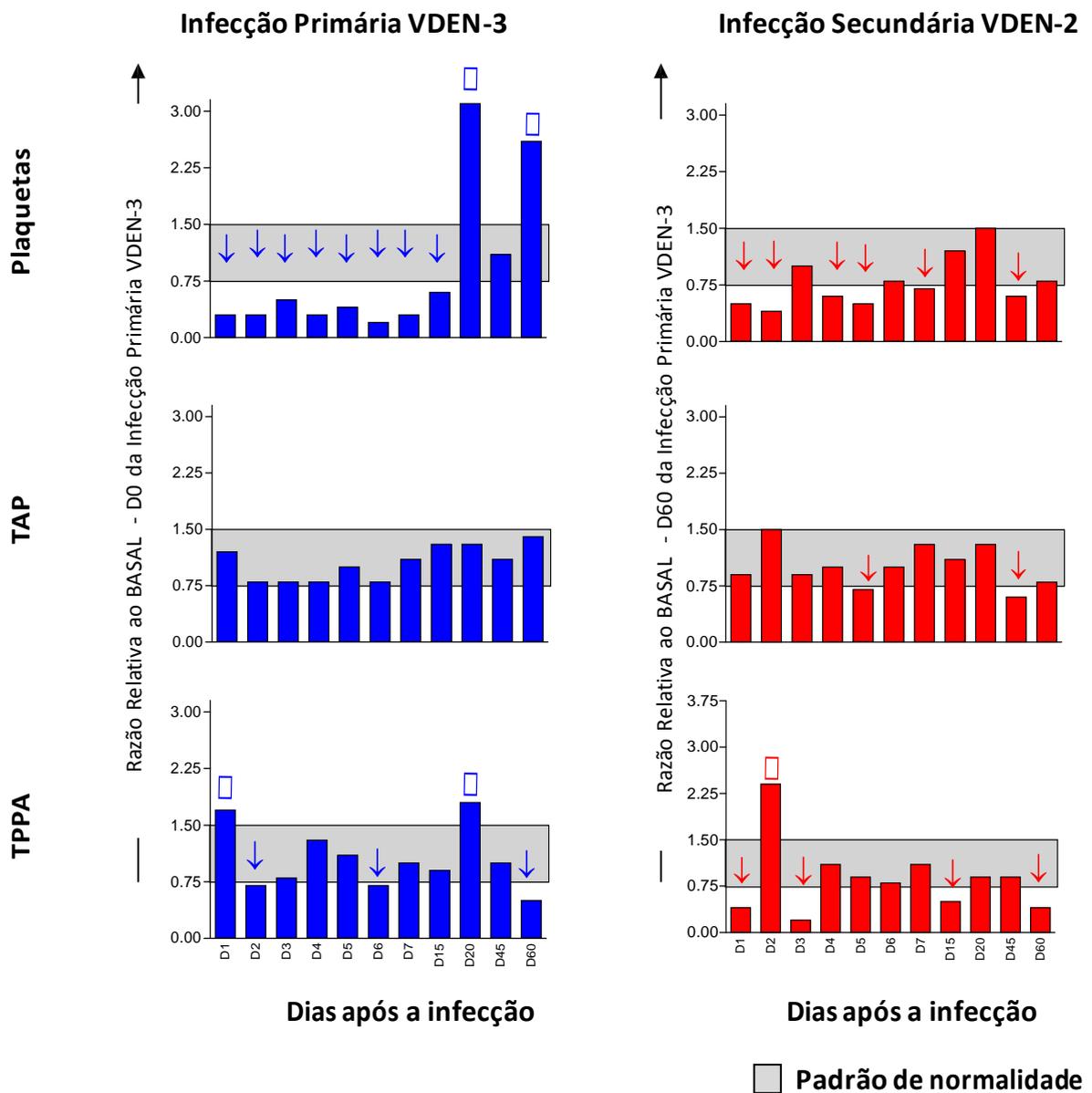
Figura 15: Avaliação do leucograma dos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2.



6.3.3 Contagem de plaquetas e avaliação do coagulograma

Na infecção primária (VDEN-3) foi evidenciado a diminuição do número de PLT (do 1^o ao 15^o d.p.i.) e elevação no 20^o e 60^o d.p.i., diminuição dos valores do TTPA (2^o, 6^o e 60^o d.p.i.) e aumento no 1^o e 20^o d.p.i.. Na infecção secundária (VDEN-2) observou-se a diminuição do número de PLT (1^o, 2^o, 4^o, 5^o, 7^o e 45^o d.p.i.), no valor de TAP (5^o e 45^o d.p.i.) e do TTPA (1^o, 3^o, 15^o e 60^o d.p.i.) com elevação deste último no 2^o d.p.i. pelo VDEN-2 (Figura 16).

Figura 16: Contagem de plaquetas e avaliação do coagulograma dos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2.

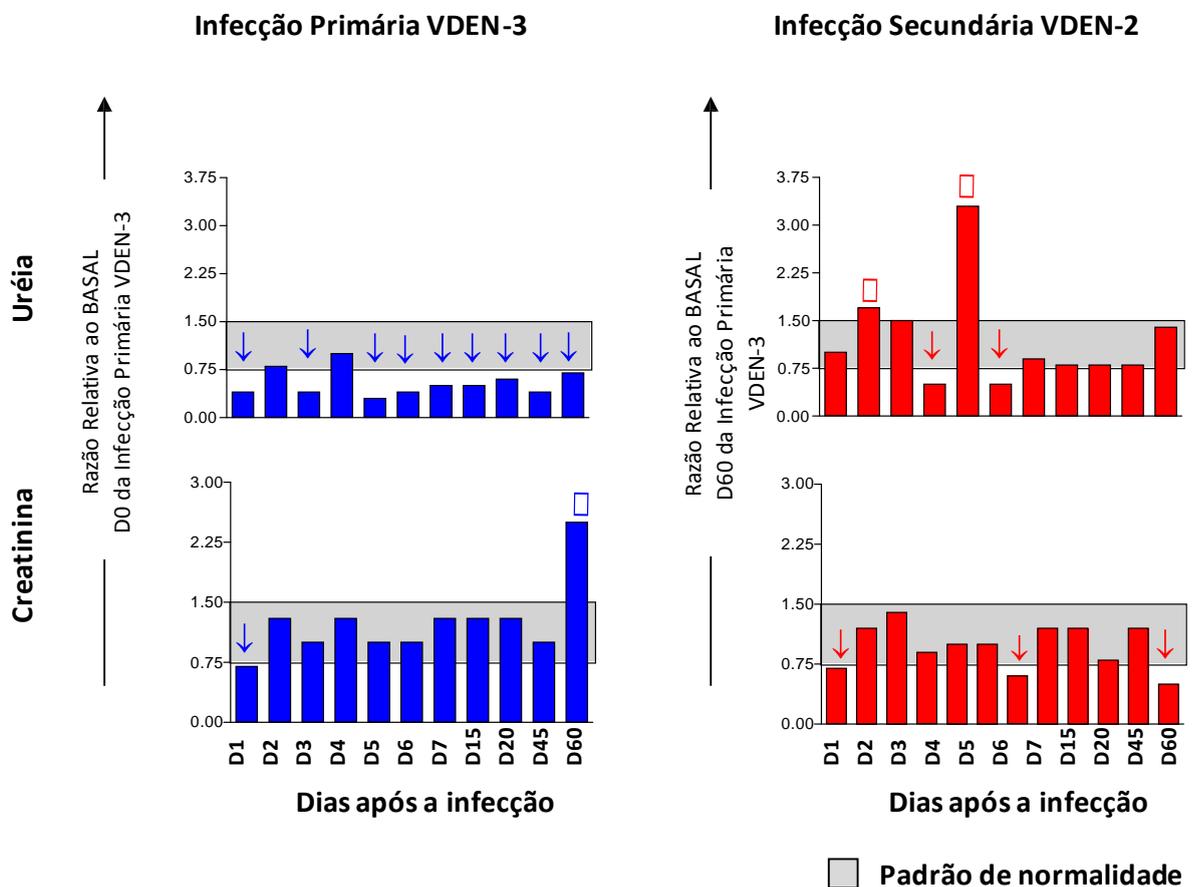


6.4 ESTUDOS BIOQUÍMICOS

6.4.1 Avaliação da função renal

As provas bioquímicas de função renal indicaram na infecção primária a diminuição dos níveis de URE (1^o, 3^o e do 5^o ao 60^o d.p.i) e de CREA (1^o d.p.i.) com aumento da CREA no 60^o d.p.i.. Na infecção secundária foi observado à diminuição dos níveis de URE (4^o e 6^o d.p.i.) com aumento no 2^o e 5^o d.p.i. e diminuição dos níveis de CREA (1^o, 7^o e 60^o d.p.i.) (Figura 17).

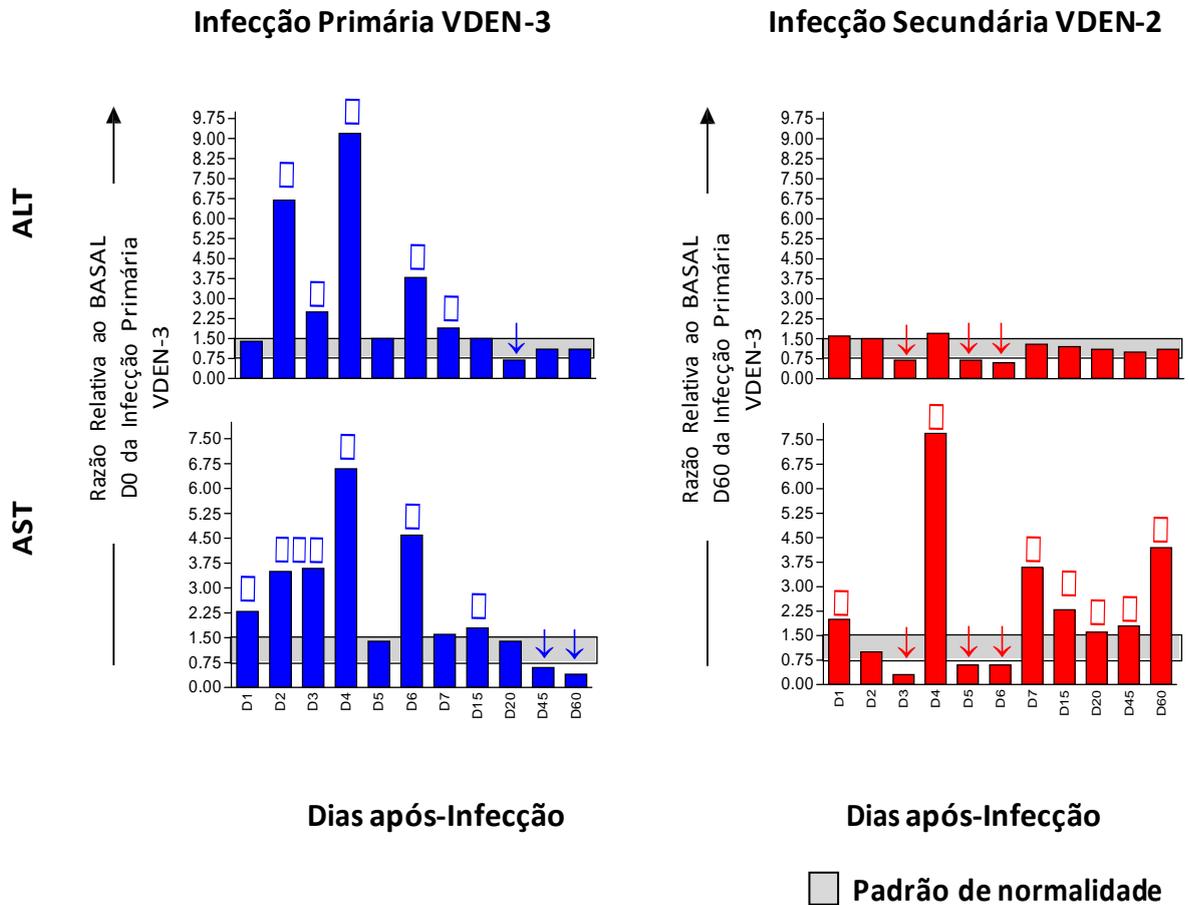
Figura 17: Provas bioquímicas de função renal dos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2.



6.4.1 Avaliação da função hepática

As provas bioquímicas de função hepática indicaram na infecção primária aumento dos níveis da ALT (2^o, 3^o, 4^o, 6^o e 7^o d.p.i.) com diminuição no 20^o d.p.i. e aumento dos níveis da AST (1^o ao 4^o, 6^o e 15^o d.p.i.) com redução no 45^o e 60^o d.p.i. Na infecção secundária foi evidenciado diminuição dos níveis de CREA (1^o, 7^o e 60^o d.p.i.); ALT (3^o, 5^o e 6^o d.p.i.) e da AST (3^o, 5^o e 6^o d.p.i.) com aumento da AST no 1^o, 4^o e do 7^o ao 60^o d.p.i. (Figura 18).

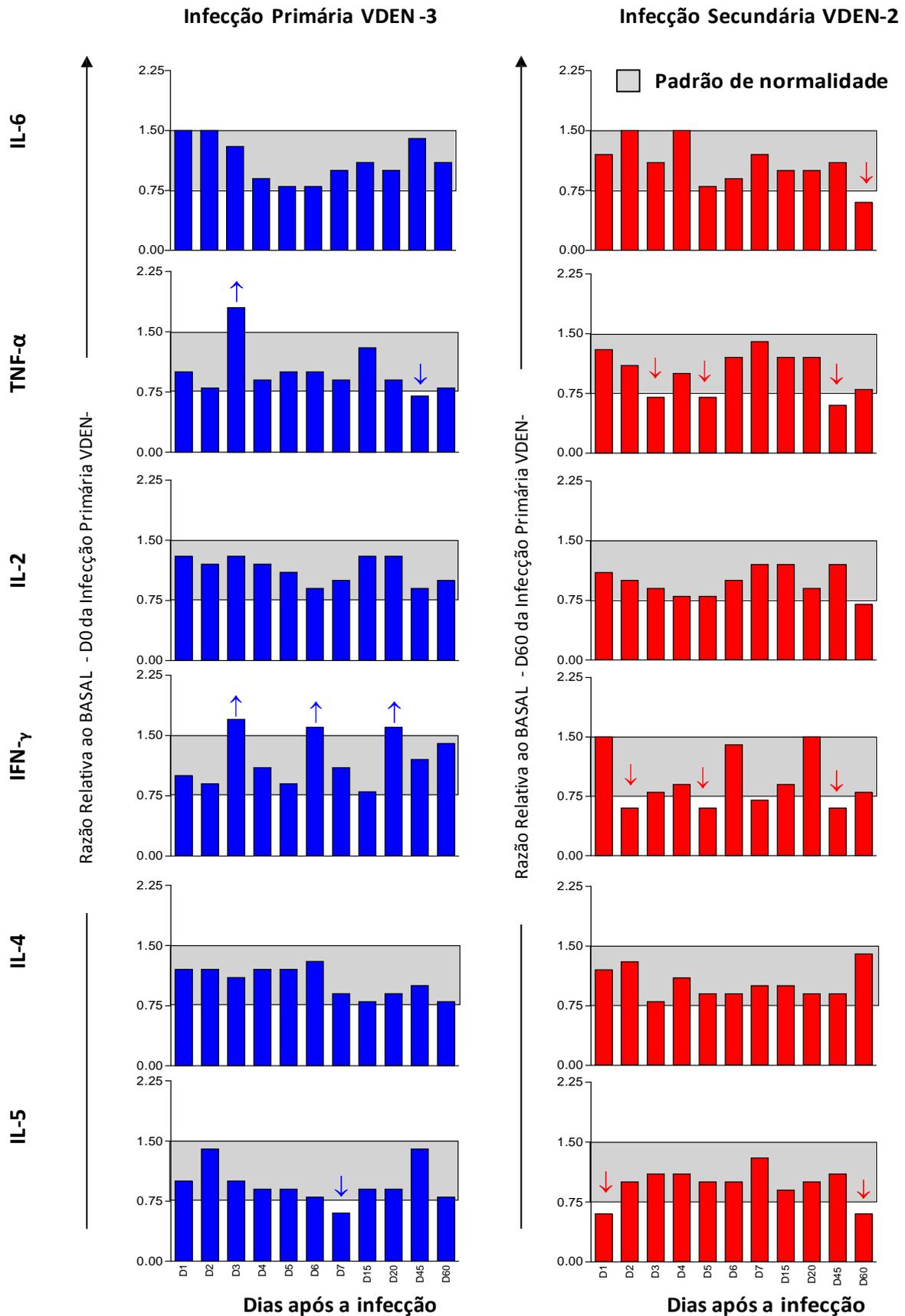
Figura 18: Provas bioquímicas de função hepática dos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2.



6.5 ESTUDOS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A dosagem das citocinas IL-6, TNF- α , IL-2, INF- γ , IL-4, IL-5 foi realizada nos soros coletados dos PNH durante o estudo experimental. Na infecção primária foi detectado o aumento dos níveis do TNF- α no 3^o d.p.i. e diminuição no 45^o d.p.i., elevação dos níveis do INF- γ (3^o, 6^o e 20^o d.p.i.) e diminuição dos níveis da IL-5 (7^o d.p.i.). Na infecção secundária foi evidenciado a diminuição dos níveis da IL-6 (60^o d.p.i.), TNF- α (3^o, 5^o e 45^o d.p.i.), INF- γ (2^o, 5^o e 45^o d.p.i.) e IL-5 (1^o e 60^o d.p.i.) (Figura 19).

Figura 19: Detecção de citocinas nos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2.



6.6 SÍNTESE DOS ACHADOS ENCONTRADOS NO ESTUDO EXPERIMENTAL

O quadro 5 sintetiza os achados observados nos PNH infectados com o VDEN-3 e com o VDEN-2 durante o estudo experimental. Durante a infecção primária (VDEN-3) foram detectados anticorpos IgM no 15^o e no 20^o d.p.i., e anticorpos IH do 15^o ao 60^o d.p.i., bem como foram evidenciados os achados abaixo:

- Dia 0: diminuição do HCT, das PLT, da URE, da CREA e aumento dos MO, do TTPA e da AST;
- Dia 2: diminuição dos MO, dos LI, das PLT, do TTPA e aumento dos, NE, da ALT, da AST;
- Dia 3: diminuição dos RBC, da HGB, do HCT, dos NE, dos MO, das PLT e da URE e aumento dos LI, da ALT, da AST, do TNF- α e do INF- γ ;
- Dia 4: diminuição das RBC, da HGB, do HCT, dos WBC e das PLT e aumento da ALT e da AST;
- Dia 5: diminuição do HCT, dos MO, das PLT e da URE;
- Dia 6: diminuição dos WBC, dos LI, das PLT, do TTPA e da URE e aumento da ALT, da AST e do INF- γ ;
- Dia 7: diminuição dos WBC e das PLT da URE e da IL-5 e aumento dos MO a ALT;
- Dia 15: diminuição dos WBC, das PLT e da URE e aumento dos MO e da AST;
- Dia 20: diminuição da URE e da ALT e aumento das PLT, do TTPA e do INF- γ ;
- Dia 45: diminuição ds WBC, dos LI, da URE, da AST, do TNF- α e do peso e aumento das RBC, da HGB e do HCT;
- Dia 60: diminuição dos NE, dos MO, do TTPA, da URE, da AST e do peso e aumento dos WBC, dos LI, das PLT e da CREA.

Durante a infecção secundária (VDEN-2) foram detectados anticorpos IgM no 15^o e no 20^o d.p.i. e anticorpos IH do 1^o ao 60^o d.p.i., bem como foram encontradas às alterações descritas abaixo e no quadro 5:

- Dia 1: diminuição do HCT, das PLT, do TTPA, da CREA e da IL-5 e aumento dos MO e da AST;
- Dia 2: diminuição das PLT, do INF- γ e aumento do TTPA e da URE;
- Dia 3: diminuição das RBC, do HCT, do TTPA, da ALT, da AST e do TNF- α ;
- Dia 4: diminuição dos RBC, do HCT, dos MO, das PLT, da URE e aumento dos LI e da AST;

- Dia 5: diminuição dos RBC, do HCT, dos MO, das PLT, do TAP, da ALT e da AST TNF- α e do INF- γ e aumento da URE;
- Dia 6: diminuição dos WBC e da URE, da ALT e da AST;
- Dia 7: diminuição dos WBC, das PLT e da CREA e aumento da AST;
- Dia 15: diminuição dos WBC, dos NE e do TTPA e aumento da AST;
- Dia 20: diminuição dos WBC e aumento da AST;
- Dia 45: diminuição dos WBC, dos MO, dos LI, das PLT, do TAP, do TNF- α , do TNF- α e do INF- γ e aumento da AST;
- Dia 60: diminuição do TTPA, da CREA, da IL-6 e da IL-5 e aumento dos MO e da AST.

Quadro 5: Síntese dos achados encontrados nos PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados sequencialmente pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2.

| Parâmetros | Infecção primária | | | | | | | | | | | | Infecção secundária | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|----|---------------------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D15 | D20 | D45 | D60 | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D15 | D20 | D45 | D60 | | |
| Anticorpos Ig I | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↑ | ↑ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↑ | ↑ | ☐ | ☐ | | |
| Anticorpos IH | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | | |
| Eritrócitos | | ☐ | ☐ | ↓ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↑ | ☐ | ☐ | ↓ | ↓ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | | |
| Hemoglobina | | | | | | | ☐ | | | | | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | | |
| Hematócrito | | ☐ | ☐ | ↓ | ↓ | ☐ | | ☐ | ☐ | ☐ | ↑ | ↓ | ☐ | ↓ | ↓ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | | |
| Leucócitos | | | | | | | ☐ | | | | | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ☐ | | |
| Neutrófilos | | ↓ | ☐ | ↓ | ↓ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↑ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | | |
| Monócitos | | | | | | | ☐ | | | | | ↑ | ☐ | ☐ | ↓ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ↑ | | |
| Linfócitos | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ↓ | ↓ | ↓ | ☐ | ↓ | ↑ | ☐ | ☐ | ☐ | ↑ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | | |
| Plaquetas | ☐ | ↑ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ↓ | ↓ | ☐ | ↓ | ↓ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | | |
| TAP | ↑ | ↓ | ↓ | ☐ | ↓ | ☐ | ↑ | ↑ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | | |
| TTPA | ☐ | ↓ | ↑ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ↓ | | |
| Ureia | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | ☐ | ↑ | ☐ | ↑ | ☐ | ↓ | ↑ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | | |
| Creatinina | | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | | |
| ALT | | | | | | | ☐ | | | | | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ↓ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | | |
| AST | ↑ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ↑ | ☐ | ↓ | ↑ | ☐ | ↓ | ↑ | ↓ | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | | |
| IL-6 | ↓ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | | |
| TNF-α | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↑ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | | |
| IL-2 | | ☐ | ↑ | ↑ | ↑ | ☐ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | | |
| INF-γ | | | | | | | ☐ | | | | | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | | |
| IL-4 | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ☐ | ↑ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | | |
| IL-5 | | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ↓ | | |
| Peso | | | | | | | ☐ | | | | | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | ☐ | | |

Nota: TAP= tempo de atividade de protrombina; TTPA=tempo de tromboplastina parcial ativa; AST=aspartato-aminotransferase; ALT= alanino-aminotransferase; IL-2, 4, 5, 6= interleucina 2, 4, 5, 6; TNF-α=fator de necrose tumoral alfa; INF-γ=interferon gama; [☐] = negativo ou dentro dos padrões de normalidade; ↑=acima dos padrões de normalidade; ↓=abaixo dos padrões de normalidade.

7 DISCUSSÃO

Atualmente, todos os modelos animais utilizados para estudos do VDEN apresentam limitações inerentes e não imitam fielmente os quadros de FHD/SCD observados em humanos (ONLAMOON et al., 2010; ZOMPI E HARRIS, 2012). É provável que esse fato seja justificado pela limitada infectividade e pela modesta replicação do VDEN observados nesses animais. Os PNH da espécie *C. penicillata* infectados sequencialmente com o VDEN-3 e com o VDEN-2 investigados nesse estudo apresentaram poucos ou nenhum sinal clínico de doença. Os sinais de doença (apatia, pêlos errepitados e perda de peso) foram observados apenas durante a infecção primária (VDEN-3) e acredita-se que a ausência de sinais de doença durante a infecção secundária (VDEN-2) tenha se dado pela neutralização do vírus por anticorpos adquiridos previamente durante a infecção primária. Vale ressaltar que a metodologia adotada apesar de ter sido adequada ao experimento apresentou limitações inerentes ao modelo.

Recentemente, Omatsu e colaboradores (2011) desenvolveram estudos com saguis da espécie *C. jaccus* infectados com um dos quatro sorotipos do VDEN isolados de casos clínicos de dengue em humanos e observaram o estabelecimento da infecção após a inoculação primária do VDEN (VDEN-1 ou VDEN-2 ou VDEN-3 ou VDEN-4). Os RNA virais foram detectados em todos os saguis infectados experimentalmente, bem como foram detectados anticorpos IgM anti-VDEN-1, anti-VDEN-2 e anti-VDEN-3 no dia 5 e anti-VDEN-4 no dia 7 após a infecção primária.

Estudos realizados por Bernardo e colaboradores (2007) com o objetivo de comparar a resposta imunológica e a capacidade de proteção cruzada em *Macacas fascicularis* infectadas primariamente com VDEN-2 cepa A15 ou cepa Jamaica (ambas genótipo americano) ou cepa I348600 (genótipo asiático) detectaram anticorpos IgM do 7^o ao 60^o d.p.i. e os maiores níveis de anticorpos IgM foram detectados no 15^o d.p.i.. Ao transcorrer 1 ano, os pesquisadores reinfectaram os animais com o VDEN-2 cepa A15 (infecção secundária) e detectaram anticorpos IgM anti-VDEN-2 no 5^o e 6^o d.p.i. Também foi evidenciado resposta duradoura do 15^o ao 60^o d.p.i.. Durante a infecção secundária (VDEN-2 cepa A15) os anticorpos IgM foram detectados por um período mais curtos e os níveis de anticorpos IgM foram mais baixos quando comparados aos valores encontrados na infecção primária. Em contraste, somente em um animal foi detectado anticorpos IgM até 60^o d.p.i. pelo VDEN-2 cepa A15. Em humanos infectados com VDEN, o início da fase de convalescença é caracterizado por níveis de anticorpos IgM significativamente menores em infecções secundárias quando comparados aos

valores encontrados em infecções primárias e podem ser mesmo indetectáveis em alguns casos, dependendo do ensaio utilizado (CHANAMA et al., 2004).

Esses achados corroboram com o presente estudo no qual foram detectados anticorpos IgM anti-VDEN-3 no 15^o e no 20^o d.p.i. pelo VDEN-3 (infecção primária) e baixos níveis de anticorpos IgM anti-VDEN-2 no 15^o e no 20^o d.p.i. pelo VDEN-2 (infecção secundária). Durante a infecção primária foi evidenciada reação cruzada com os demais sorotipos do VDEN diferente da infecção secundária na qual a resposta foi monotípica para o VDEN-2.

Bernardo e colaboradores (2007) também detectaram nos animais infectados com o VDEN-2 (cepa A15 ou cepa Jamaica ou I348600) durante a infecção primária anticorpos IH anti-VDEN-2 a partir do 10^o d.p.i. e os maiores títulos de anticorpos IH foram detectados no 15^o d.p.i.. Os pesquisadores também observaram reação cruzada, ou seja, anticorpos IH para os demais sorotipos do VDEN no grupo de PNH infectados com o VDEN-2 cepa A15 (infecção primária). Em contraste, o grupo dos animais infectados com o VDEN-2 cepa Jamaica (infecção primária) foi observado reação cruzada apenas para o VDEN-4. Na infecção primária (VDEN-2 cepa A15 ou cepa Jamaica) os anticorpos IH anti-VDEN-2 mantiveram-se detectáveis ao passar do tempo, enquanto que os anticorpos IH anti os demais sorotipos de VDEN decresceram rapidamente. Na infecção secundária nos PNH infectados com VDEN-2 cepa A15 foi observado logo após os primeiros dias após a infecção um rápido aumento dos títulos de anticorpos IH para os quatro sorotipos do VDEN e a diminuição desses títulos com o passar do tempo.

Diversos estudos de investigação soropidemiológico em humanos descrevem a reatividade cruzada entre os quatro sorotipos do VDEN com os demais vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* em indivíduos infectados com VDEN (CRUZ et al., 2009). No Brasil, há relatos que descrevem a detecção de anticorpos IH em PNH sentinelas de vida livre e criados em cativeiro, bem como a reatividade cruzada desses anticorpos para vírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus* (BATISTA et al., 2012).

Esses achados são semelhantes aos evidenciados no presente estudo no qual foram detectados anticorpos IH do 15^o ao 60^o d.p.i. pelo VDEN-3 (infecção primária) e altos títulos de anticorpos IH a partir do 1^o d.p.i. pelo VDEN-2 (infecção secundária) os quais perduraram até o fim do experimento. A reação cruzada de anticorpos entre os sorotipos do VDEN e entre os demais vírus do gênero *Flavivirus* (*Vírus da febre amarela*, *Vírus da Encefalite Saint Louis*, *Vírus Ilhéus* e *Vírus Rocío*) também foi evidenciada conforme descrito na literatura.

Onlamoon e colaboradores (2010) realizaram avaliações laboratoriais incluindo hemograma, bioquímica sérica e proteínas envolvidas no sistema de coagulação e

complemento em macacos Rhesus infectados com VDEN. A avaliação do eritrograma indicou uma ligeira diminuição dos níveis de hemoglobina, uma significativa redução dos valores do hematócrito e nenhuma alteração no número de hemácias durante a infecção aguda causada pelo VDEN nos PNH. O leucograma indicou uma significativa leucopenia nos dias 1, 3, 5, 7 e 10 e leucocitose no dia 14 após a infecção. Supõem-se que a leucopenia foi causada pela diminuição dos neutrófilos que comumente é relatada em humanos infectados com VDEN (SIMMONS et al., 2012). Também foi observado uma discreta linfocitose no fim da fase aguda e nenhuma alteração no número de monócitos foi detectada. Também foram evidenciados plaquetopenia, um modesto aumento dos níveis das enzimas AST e ALT, uma discreta diminuição do TAP e um significativo aumento do TTPA durante a fase aguda.

Semelhante aos achados de Onlamoon e colaboradores (2010), o presente estudo detectou uma ligeira diminuição dos níveis de hemoglobina e dos valores do hematócrito durante a infecção aguda causada pelo VDEN-3 (infecção primária). De forma semelhante também foi evidenciado leucopenia ocasionada pela diminuição dos neutrófilos, monócitos e linfócitos após a infecção primária (VDEN-3). Diferente dos achados de Onlamoon e colaboradores (2010), foi detectado uma pequena diminuição do número de eritrócitos. A trombocitopenia observada nos primeiros dias após as infecções tanto pelo VDEN-3 (infecção primária) como pelo VDEN-2 (infecção secundária) nos PNH corrobora com os relatos encontrados tanto em humanos como nos demais modelos experimentais sendo este achado indicativo de infecção e de extrema relevância encontrado nesse estudo (SIMMONS et al., 2012; ONLAMOON et al., 2010). Também foram evidenciados a diminuição do TAP e do TTPA em ambas infecções. Contudo, é importante assinalar a necessidade de outros estudos com um maior número de animais para que se possa avaliar os diferentes perfis (hematológicos, bioquímicos e coagulação) encontrados durante a cinética do experimento.

Em um estudo anterior realizado por Koraka e colaboradores (2007) com dois grupos distintos de *Macacas fasciulares*: um infectado com VDEN-1 e outro infectado com o VDEN-2 (infecção primária), secundariamente com VDEN-3 (infecção secundária) e por terceiro com o VDEN-4 (infecção terciária) foram detectados e analisados a resposta citocínica nesses PNH. Os pesquisadores detectaram níveis de citocinas pró-inflamatória (IFN- γ e TNF- α) e interleucinas (IL-10, IL-4 e IL-8) durante os 9 primeiros dias após a infecção do VDEN-3 (infecção secundária) nos animais. No entanto, as respostas citocínicas encontradas tanto na infecção primária (VDEN-1 ou VDEN-2) como na infecção secundária (VDEN-3) apresentaram níveis de expressão de citocinas distorcidos o que impossibilitou qualquer inferência sobre o perfil da resposta imunológica nesses animais. Após a infecção

secundária (VDEN-3) foi observado nos animais infectados com VDEN-1 (infecção primária) um discreto aumento dos níveis de IL-4 no 2^o e 3^o d.p.i. e um modesto aumento da IL-8 no 5^o e 6^o d.p.i. pelo VDEN-3. No grupo dos PNH infectados sequencialmente com o VDEN-3 ou com o VDEN-4 foi observado uma diminuição dos níveis de INF- γ no 2^o e 3^o d.p.i. e IL-10 no 3^o e 4^o d.p.i. pelo VDEN-3.

No presente estudo os níveis séricos de INF- γ e TNF- α encontrados indicaram a ativação da resposta inflamatória, com a diferenciação para a resposta celular e supressão da resposta humoral evidenciado pela diminuição dos níveis séricos de IL-5. O modesto aumento dos níveis de TNF- α e IFN- γ encontrados nos PNH durante o estudo experimental diferem dos casos de FHD/SCD em humanos, onde células T promovem reação cruzada que contribuem para a imunopatogênese da doença grave através da produção de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias, sendo detectados altos níveis de TNF- α e IFN- γ (DUNG et al., 2010; ROTHMAN, 2011). Contudo, os achados podem ser justificados por publicações que relatam que apenas uma pequena porcentagem de casos de dengue evoluem para a FHD/SCD e a maioria dos quais decorrem de infecção secundária costumam ser assintomáticos ou manifestam-se como FD, ou seja, a resposta adaptativa pode induzir proteção heterotípica eficaz durante a infecção secundária (ROTHMAN, 2011; ZOMPI et al., 2011;).

Zompi e colaboradores (2011) em um estudo experimental com camundongos A129 infectados sequencialmente com o VDEN-1 e com o VDEN-2 observaram após 6-8 semanas a produção de anticorpos protetores por células de longa vida do plasma e por células B de memória que conferiram reatividade cruzada e proteção contra o VDEN-2 causador da infecção secundária. Esses achados corroboram com os dados encontrados no presente estudo que indicam que a infecção sequencial pelo VDEN-3 e pelo VDEN-2 pode ter conferido imunidade protetora aos animais, causando sinais característicos da FD e não de FHD/SCD.

Os PNH da espécie *C. penicillata* são um bom modelo para estudos da resposta imunológica da FD. Contudo, alguns questionamentos foram levantados durante o estudo: A via de infecção, a replicação viral e o tempo transcorrido entre as infecções interferiram para a ausência de sinais da FHD/SCD? Semelhantes aos achados evidenciados no presente estudo Halstead (1981) realizou experimentos com PNH infectados com o VDEN pela via subcutânea e detectou uma expressiva trombocitopenia. Contudo, nenhum sinal clínico aparente foi observado. Diferentemente Onlamoon e colaboradores (2010) inocularam experimentalmente altos títulos de VDEN-2 pela via intravenosa em macacos Rhesus e observaram do 3-5 d.p.i. pelo VDEN-2 sinais visíveis de hemorragia (petéquias e hematomas) semelhantes aos observados em humanos infectados com VDEN.

Koraka e colaboradores (2007) mencionam que distintos sorotipos do VDEN podem apresentar diferentes características de replicação na mesma espécie animal, assim como o mesmo sorotipo ou inóculo viral pode apresentar diferentes padrões de replicação viral em animais da mesma espécie. Esse relato talvez justifique os diferentes perfis (hematológicos, bioquímicos e coagulação) encontrados durante a cinética experimental desse estudo. Kuno e colaboradores (1987) descreveram que a infecção primária produz proteção temporária e parcial contra os outros três sorotipos, permitindo que infecções secundárias ou sequenciais sejam possíveis após um curto período de tempo (2 a 3 meses). Tal relato corrobora com o tempo transcorrido entre as infecções e com os achados laboratoriais que comprovam o estabelecimento das infecções no presente estudo. Contudo, diferiu do resultado esperado que seria a presença de sinais de FHD/SCD e não a suposta neutralização do vírus.

Embora o presente estudo esteja de acordo com os relatos encontrados na literatura não foi possível esclarecer tais questionamentos levantados. Desta forma fazem-se necessários maiores estudos com o maior número de animais infectados com o VDEN com o intuito de elucidar tais questões.

8 CONCLUSÃO

- Os primatas não humanos (PNH) da espécie *Callithrix penicillata* demonstraram susceptibilidade à cepas de *Vírus dengue* (VDEN) de isolados provenientes de casos fatais de Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome do Choque do Dengue (FHD/SCD).
- As duas amostras (uma do VDEN-3 e outra do VDEN-2) induziram a produção de anticorpos IgM, os quais foram detectados no 15^o e no 20^o d.p.i. tanto pelo VDEN-3 (infecção primária) como pelo VDEN-2 (infecção secundária). Durante a infecção primária também foi observado reatividade cruzada para os demais sorotipos do VDEN. Durante a infecção secundária (VDNE-2) a resposta foi monotípica para o sorotipo infectante.
- As amostras do VDEN-3 e do VDEN-2 induziram a produção de anticorpos inibidores da hemaglutinação, os quais foram detectados nos soros dos PNH do 15^o ao 60^o d.p.i. pelo VDEN-3 (infecção primária) e do 1^o ao 60^o d.p.i. pelo VDEN-2 (infecção secundária). Também foi evidenciado reação cruzada entre os sorotipos do VDEN e os demais vírus do gênero *Flavivirus* (*Vírus da febre amarela*, *Vírus da Encefalite Saint Louis*, *Vírus Ilhéus* e *Vírus Rocío*). As infecções oriundas das amostras do VDEN-3 e do VDEN-2 de casos fatais de FHD/SCD resultaram em títulos de anticorpos IH semelhantes aos observados em humanos infectados com VDEN.
- A avaliação hematológica revelou alterações indicativas do estabelecimento da infecção como: leucopenia e trombocitopenia. A diminuição do TTPA evidenciada no coagulograma diferiu dos padrões encontrados em humanos com Febre do Dengue (DF). O aumento dos níveis séricos das enzimas ALT e AST durante a infecção primária (VDEN-3) reproduziu os relatos encontrados em infecções causadas pelo VDEN em humanos. Os baixos valores de uréia e creatinina diferiram dos altos valores evidenciados em humanos com FD ou FHD/SCD.
- O aumento dos níveis de INF- γ e TNF- α indicaram a ativação da resposta inflamatória, com a diferenciação para a resposta celular e supressão da proliferação de citocinas características da resposta humoral. A presença de anticorpos neutralizantes pode ter ocasionado a supressão da resposta inflamatória na infecção secundária o que pode ter levado a ausência de sinais de FHD/SCD durante a infecção secundária (VDEN-2).
- Os resultados indicam que os PNH da espécie *Callithrix penicillata* são um bom modelo para estudos da resposta imunológica da FD, assim como para a avaliação de uma vacina tetravalente.

9 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, p.14-15, 2008.
- ACOSTA, E.G., CASTILLA, V., DAMONTE, E.B. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **J. Gen Virol**, n. 89, p. 474-484, 2008.
- ASHBURN, P.M., CRAIG, C.F. Experimental investigations regarding the aetiology of dengue fever, with a general consideration regarding the disease. *Phillipp. J. Sci. B.*, n. 2, p. 93-151, 1907.
- AYRES, M., JUNIOR-AYRES, M., AYRES, D.L., SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. p. 364, 2007.
- AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, p. 168, 1995.
- 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. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. **Plos Patho**, v. 6, n. 2, p. 10007-90, 2010.
- BATISTA, P.M.; ANDREOTTI; R.; CHIANG; J.O.; FERREIRA; M.S.; VASCONCELO, P.F.C. Seroepidemiological monitoring in sentinel animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 45, n. 2, 2012.
- BAYNES, J.W.; DOMUNICZOK, M.M. *Bioquímica Médica*, Rio de Janeiro, 2 ed., Elsevier, p. 631-634, 2007.
- BELL, J.K., MULLEN, G.E., LEIFER, C.A., MAZZONI, A., DAVIES, D.R., SEGAL, D.M. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. **Trends Immunol**, n. 24, p. 528-533, 2003.
- BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G.; **Imunologia**, 4 ed., Eli Guanabara Koogan, p.135-147, 2002.
- BENTE, D.A., MELKUS, M.W., GARCIA, J.V., RICO-HESSE, R. Dengue Fever in Humanized NOD/SCID Mice. **Journal of Virology**, n. 79, p. 13797-99, 2005.
- BENTE, D.A., RICO-HESSE, R. Models of Dengue Virus Infection. **Drug Discovery Today: Disease Models**, n. 3, p. 97-103, 2006.
- BERNARDO, L., ALIENYS, I., IRINA, P., DELFINA, R., MAYLING, A., EMIDALYS, S., CASTRO, J., MARTINEZ, R., RODRÍGUEZ, R., MORIER, L., GUILLÉN, G., GUZMAN, M.G. Primary and Secondary Infections of *Macaca fascicularis* Monkeys with Asian and American Genotypes of Dengue Virus 2. **Clinical and Vaccine Immunology**, n. 3, p. 439-446, 2007.

BHARAJ, P., CHAHAR, H.S., PANDEY, A., DIDDI, K., DAR, L., GULERIA, R., KABRA, S.K., BROOR, S. Concurrent Infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. **Virology Journal**, n. 5, p. 1, 2008.

BLANEY, J.E., MATRO, J.M., MURPHY, B.R., WHITEHEAD, S.S. Recombinant, live attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. **J Virol**, n. 79, p. 5516–5528, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia**, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica. Fundação Nacional de Saúde**. 5 ed., Brasília: FUNASA, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Dengue: Diagnóstico e Manejo Clínico, Adulto e Criança**. 3 ed. Brasília, p. 28, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde; **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7 ed., 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Rede Dengue: Inovação da Abordagem e da Gestão em Pesquisa à Saúde. **Revista Saúde Pública**, v. 44, n. 6, p.1159-63, 2010a.

BRASIL, Ministério da Saúde. **NOTA TÉCNICA N.º 01**, 2010b. Disponível em:<www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/vetores/dengue/nota_tecnica_dengue_01-2010.pdf>. Acesso em: 03/01/2011

BRASIL, Ministério da Saúde. **NOTA TÉCNICA N.º 118**, 2010c. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_denv_4_24_09_2010_eh.pdf>. Acesso em: 04/01/2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Impactos e desafios no controle das doenças transmissíveis, Dengue**. In: Vigilância em Saúde: panoramas, conjuntas, cartografias: gestão 2009-2010, p. 37-49, 2010d.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Balanco Dengue: Informe Janeiro- Março**, 2010e.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Agentes Biológicos**, 3 ed., 2010f.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota Técnica N° 3: CGPNCD/SVS/MSFVS/SES-AMSMS-MANAUS**, 2011a. Disponível em: <[Http://Portal.Saude.Gov.Br/Portal/Arquivos/Pdf/Isolamento_Denv4_Manus.Pdf](http://Portal.Saude.Gov.Br/Portal/Arquivos/Pdf/Isolamento_Denv4_Manus.Pdf)>. Acesso em: 10/01/2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota Técnica N° 12: CGPNCD/DEVEP/SVS/MS SES-PA SMS-BELÉM**, 2011b. Disponível em: <[Http://Portal.Saude.Gov.Br/Portal/Arquivos/Pdf/Nt_Para_Denv4_18_01_11.Pdf](http://Portal.Saude.Gov.Br/Portal/Arquivos/Pdf/Nt_Para_Denv4_18_01_11.Pdf)>. Acesso em 20/01/2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota Técnica N° 33: CGPNCD/DEVEP/SVS/MS FVS/SES-AM SMS-MANAUS**, 2011c. Disponível em:
<[Http://Portal.Saude.Gov.Br/Portal/Arquivos/Pdf/Nt_33_Denv4_Manaus_05_02_2011_3.Pdf](http://Portal.Saude.Gov.Br/Portal/Arquivos/Pdf/Nt_33_Denv4_Manaus_05_02_2011_3.Pdf)>. Acesso em: 10/03/2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: criança** / Brasília; p.52, 2011d.

BRASIL, Ministério da Saúde, 2012 . Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4452/162/numero-de-casos-de-dengue-cai-61-no-primeiro-bimestre.html>> Acesso em 21/05/2012:

BUTTHEP, P., BUNYARATVEJ, A., BHAMARAPRAVATI, N. Dengue virus and endothelial cell: a related phenomenon to thrombocytopenia and granulocytopenia in dengue hemorrhagic fever. Southeast Asian. **J Trop Med Public Health**, n. 24, p. 246-249, 1993.

CDC. Locally acquired Dengue- Key West. Florida, 2009-2010. **MMWR Morb. Mortal Wkly.**, 59, p.577-581, 2010.

CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R., RICE, C.M. Flavivirus Genome, Organization, Expression and Replication. **Annual Reviews of Microbiology**, n. 40, p. 649-688, 1990.

CHANAMA, S. et al. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, p.185-189, 2004,.

CASALI, C.G., PEREIRA, M.R.R., SANTOS, M.L.J.G., PASSOS, M.N.P., FORTES, B.P.M.D., VALENCIA, L.I.O., ALEXANDRE, A.J., MEDRONHO, R.A. The Epidemic of Dengue and hemorrhagic Dengue Fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 37, p. 296-299, 2004.

CASTRO, J.A.F., ANDRADE, H.M., MONTE, S.J.H., SILVA, A.S., GOMES, K.C.B.L., AMARAL, L.F.B., CIPRIANO, F.O., REGO, J.V., ARAÚJO, M.A.M., FAUSTINO, S.K.M., NOGUEIRA, R.M.R., SCHATZMAYR, H.G., MIAGOSTOVICH, M.P. Dengue Viruses Activity in Piauí, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 98, p. 1021-1023, 2003a.

CASTRO, P. H. G. **Propondo um problema de forrageio como meio de enriquecer o cativeiro: um estudo comparativo de duas espécies de primatas brasileiros (Callithrix penicillata e Saguinus imperator)**. Dissertação (Mestrado em psicologia) - Universidade Federal do Pará, Belém, 43f., 2003b.

CAUSEY, O.R., THEILER, M. Virus antibody survey on sera of residents of the Amazon Valley in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, n. 7, p. 36-41, 1958.

CHANAMA S., ANANTAPREECHA, S., A-NUEGOONPIPAT, A., SA-GNASANG, A., KURANE, I., SAWANPANYALERT, P. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. **Journal of Clinical Virology**, n. 31, p.185-189, 2004.

CHATURVEDI, U.C., AGARWAL, R., ELBISHBISHI, E.A. MUSTAFA, A.S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, n. 28, p. 183-188, 2000.

CHATURVEDI, U.C., NAGAR, R., SHRIVASTAVA, R. Macrophage & dengue vírus: Friend or foe? **Indian Journal of Medical Research**, n. 124, p. 23-40, 2006.

CHEN, W.F., YEH, W.T., YANG, M.Y. A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infection. **Fems Immunol. Med. Microbiol.**, n. 30, p. 1-7, 2001.

CITV, **Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses-Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Elsevier Academic Press, San Diego, p. 1259, 2005.

CLARKE, D.H., CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 7, p. 561-573, 1958.

CLEMENTS, D.E., COLLER, B.A., LIEBERMAN, M.M., OGATA, S., WANG, G., HARADA, K.E, PUTNAK, J.R., IVY, J.M., MECDONELL, M., BIGNAMI, G.S., et al., Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: Immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. **Vaccine**, n. 28, p. 2705-2715, 2010.

COLOGNA, R., RICO-HESSE, R. American Genotype Structures decreased Dengue Virus Output from Human Monocytes and Dendritic Cells. **Journal of Virology**, n. 77, p. 3929-3938, 2003.

CRUZ, A.C.R.; PRAZERES, A.S.C.; GAMA, E.C.; LIMA, M.F.; AZEVEDO, R.S.S.; CASSEB, L.M.N; NUNES NETO, J.P.; MARTINS, L.C.; CHIANG, J.O.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C. . Vigilância Sorológica para Arbovírus em Juruti, Pará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública (ENSP. Impress)**, v. 25, p. 1153-1159, 2009.

DE BARROS, V.L.S., DE SOUZA, J.T., COSTA, Z.G.A, DE ARAUJO, M.T.F, BRAGA, R.R. Diagnóstico de febre hemorrágica em Primata não humano causada pelo vírus dengue, relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** n. 42, p. 484, 2009.

DE SILVA, A.M., DITTUS, W.P.J., AMERASINGHE, P.H., AMERASINGHE, F.P. Sorologic evidence for an epizootic dengue virus infecting toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 60, p. 300-306, 1999.

DHAWAN, S. Human immunodeficiency virus-1 tat protein induces the cell surface expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1 in human endothelial cells. **Blood** 90, p. 1535-1544, 1997.

DINIZ, L.S.M. **Primatas em Cativeiro: Manejo e Problemas veterinários. Enfoque para espécies Neotropicais.** São Paulo, Icone, p. 47-53, 1997.

DUNG, N.T.; DUYEN, H.T.; THUY, N.T.; NGOC, T.V.; CHAU, N.V.; HIEN, T.T.; ROWLAND-JONES, S.L.; DONG, T.; FARRAR, J.; WILLS, B.; et al. Timing of CD8+ T cell responses in relation to commencement of capillary leakage in children with dengue. **J. Immunol.** v. 184, p. 7281–7287, 2010.

DURBIN, A.P., KIRKPATRICK, B. D., PIERCE, K.K., SCHMIDT, A.C., WHITEHEAD, S.S. Development and clinical evaluation of multiple investigational monovalente DENV vaccine to identify components for inclusion in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. **Vaccine.** n. 2, p. 7242-7250, 2011.

EHRENKRANZ, N.J., VENTURA, A.K., CUADRADO, R.R., POND, W.L., PORTER, J.E. Pandemic dengue in Caribbean countries and southern United States – past, present and potential problems. **N. Eng J. Med**, n. 285, p.1460-1469, 1971.

FINK, J., GU, F., VASUDEVAN, S.G. Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Rev Med Virol**, n. 16, p. 263-75, 2006.

FONSECA, B.A.L., FIGUEIREDO, L.T.M. **Dengue**. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 4 ed., Atheneu, p. 397-410, 2009.

FORTMAN, J.D.; HEWETT, T.Y.A., BENNETT, B.T. **The Laboratory Nonhuman Primate**. CRC Press, p. 1-33, 2002.

GEIJTENBEEK, T.B., ENGERING, A., VAN KOOYK, Y. DC-SIGN, A C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. **J Leukoc Biol**, n. 71, p. 921-931, 2002.

GJENERO-MARGAN, I., ALERAJ, B., KRAJCAR, D., LESNIKAR, V.; KLOBUCAR, A., PEM- NOVOSEL, I., KURECIC-FIPOVIC, S., KOMPARAK, S., MARTIC, R., DURICIC, S., et al Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. **Euro. Surveill.** n. 16, p. 1-4, 2011.

GLIGLIOR, A.D., KALIKA, R. **Princípios de Hematologia Clínica**, 5 ed., Manole Baueri, p. 03-12, 2007.

GOMES, C.R.P., CRUZ, E, FILÁRTIGA, D., AQUINO, D. **Imunopatogenia da Dengue Clássica e da Dengue Hemorrágica**. In Souza, L.J. Dengue: Diagnóstico, Tratamento e Prevenção. 2 ed., Rio de Janeiro, Rubio, p. 37-43 2008.

GREEN, S., KURANE, I., EDELMAN, R., TACKET, C.O., VAUGHN, D., HOKE, C.H., ECKELS, K.H., ENNIS, F.A. Dengue virus-specific human CD4+ T-lymphocyte responses in a recipient of experimental live-attenuated dengue virus type 1 vaccine: bulk culture proliferation, clonal analysis, and precursor frequency determination. **J. Virology**, n. 67, p. 5962-5967, 1993.

GUBLER, D.J., KUNO, G., SATHER, G.E. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 33, p. 158-165, 1984.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. **P R Health Sci J**, n. 6, p. 107-111, 1987.

GUBLER, D.J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: Top Down or Bottom Up. **Am J Trop Med Hyg**, n. 40, p. 571-78, 1989.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler, D.J., Kuno, G. (ed.). Dengue and dengue Hemorrhagic fever. **Cab International, London**, p. 1-22, 1997a.

GUBLER, D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st Century. **Dengue Billeting**, n. 21, p. 1-15, 1997b.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev**, n. 13, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D.J. Dengue/dengue hemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Foundation Symposium**, n. 277, p. 3-15, 2006.

GUIMARÃES, R. Princípios de Imunopatogenia da Dengue Hemorrágica. **Jornal Brasileiro de Medicina**, n. 7, 1999.

GUZMAN, M.G., KOURÍ, G. Dengue: an update. **Lancet Diseases**, n. 2, p. 33, 2002.

HALSTEAD, S.B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever VI. Hypotheses and discussion. **Yale J. Biol. Med**, n. 42, p. 350-362, 1970.

HALSTEAD, S.B. Dengue hemorrhagic fever. A public health problem and a field for Research. **Bull Wrlld Hlth Org**, n. 58, p. 1-21, 1980.

HALSTEAD, S.B. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious Disease. **Am J Epidem**, n. 114, p. 632-48, 1981.

HALSTEAD, S.B. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. **Wld Hlth Statist Quart**, n. 45, p. 292-298, 1992.

HALSTEAD, S.B. **Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever**. In: GUBLER, D.J., KUNO, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Cab International, London, p. 23-44, 1997.

HARRIS, E., HOLDEN, K.L., EDGL, D., POLACEK, C., CLYDE, K. Molecular Biology of Flaviviruses. **Novartis Foundation Symposium**, n. 277, p. 23-39, 2006.

HEARN, J.P., ABBOT, D.H., CHAMBERS, P.C., HODGES, J.K., LUNN, S.F. Use of the common marmoset, *Callithrix jacchus*, in reproductive research. **Primates Med.** v. 10, p. 40-49, 1978.

HEINZ, F.X., ALLISON, S.L. **Flavivirus Structure and Membrane Fusion**. In: **Advances In CHAMBERS, T.J., MONATH, T.P. Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.**, California, Academic Press, n. 59, p. 33-97, 2003.

- HENCHAL, E.A., PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clin Microbiol Rev**, n. 3, p. 376-96, 1990.
- HIRSCH, A.; DIAS, L.G.; MARTINS, L.O.; CAMPOS, R.F.; LANDAU, E.C.; RESENDE, N.A.T. BDGEOPRIM—Database of geo-referenced localities of Neotropical primates. **Neotrop Primates**. v. 10, p.79–84, 2002.
- IGARASHI, A. Isolation of a Singli's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. **Journal of general Virology**, n. 40, p. 531-544, 1978.
- IMBELONI, A.A., MUNIZ, J.A.P.C., SILVA, G.A., SCALERCIO, S.R.R.A., CASTRO, P.H.G., FARO, C.J.C., COSTA, M.A.S., BRANCO, E., LACRETA JUNIOR., A.C.C., ALBARELLI, L.P.P. Valores Hematológicos e Bioquímicos de *Callithrix penicillata* (É. geoffroy, 1812) Mantidos em Cativeiro no Centro Nacional de Primatas. **Congresso de Primatologia**, 2009.
- INNIS, B.J, NISALAK, A., NAMMANITYA, S., KUSAIERDCHARIYA, S. CHONGSWASDI, V., SUNPAYAKORN, S., PUPPISRI, P., HOKE, C.H. An Enzyme linked-Immunsorbent assay to Characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **Am. J. Trop. Med**, n. 40, p. 418-427, 1989.
- IRANDA, J.M.D.; HIRANO, Z.M.B. **A Primatologia no Brasil**. v. 12, p. 23, 2011.
- ITO, M., MUKAI, R.Z., TAKASAKI T., KOTAKI A., KURANE I. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro by undiluted sera from monkeys infected with heterotypic dengue virus. **Arch Virol**, n. 155, p. 1617-1624, 2010.
- JESSIE, K., YIK, F.M., SHAMALA, D., KIT, L.S., WONG, K. Thong Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, n. 189, p. 1411-18, 2004.
- JOHNSON, A.J., ROEHRIG, J.T. New mouse model for dengue virus vaccine testing. **J. Virol**. n. 73, p. 783-786, 1999.
- JUFFRIE M., VAN DER MEER, G.M., HACK, C.E., HAASNOOT, K., SUTARYO, A., VEERMAN, J.P., THIJS, L.G. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. **Infect Immun**, n. 68, p. 702-707, 2000.
- KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. **American Public Health Association, San Antonio**, p. 1041, 1985.
- KIMURA, R., HOTTA, S. Studies on dengue fever (VI). On the inoculation of dengue virus in mice. **Nippon Igaku**, n. 337, p. 264-268, 1944.
- KOCHEL, T.J., WATTS, D.M., GOZALO, A.S. EWING, D.F., PORTER, K.R., RUSSELL, K.L. Cross-serotype neutralization of dengue virus in *Aotus nancymae* monkeys. **J. Infect. Dis**, n. 191, p. 1000–04, 2005.

KORAKA, P., BENTON, S., VAN AMERONGEN, G., STITTELAAR K.J., OSTERHAUS, A. D. Efficacy of a live attenuated tetravalent candidate dengue vaccine in naive and 441 previously infected *Cynomolgus* macaques. **Vaccine**, n. 25, p. 5409-5416, 2007.

KUNO, G.; GUBLER, D.J.; VÉLEZ, M.; OLIVER, A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. **Bull Wrlld Hlth Org.** v. 63, p.279-86, 1985.

KUNO, G., GÓMEZ, I., GUBLER, D.J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Trop Med Hyg**, n. 36, p. 153-9, 1987.

KURANE, I., HEBBLEWAITE, D., ENNIS, F.A. Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody- dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. **Immunology**, n. 58, p. 429-436, 1986.

KURANE, I., MADY, B.J., ENNIS, F.A. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Rev Med Virology**, n. 1, p. 211-221, 1991a.

KURANE, I., INNIS, B.L., NIMMANNITYA, S., NISALAK, A., MEAGER, A., JANUS, J., ENNIS, F.A. Activation of T lymphocyte in dengue viruses infections: high levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2 and interferon gamma in sera of children with dengue. **J Clin Investig**, n. 88, p. 1473-1480, 1991b.

KURANE, I., ENNIS, F.A. **Immunopathogenesis of dengue virus infections.** In: GUBLER DJ, KUNO G (ed.). Dengue and dengue hemorrhagic fever. Cab International, London, p. 273-290, 1997.

LA RUCHE, G.; SOUARES, Y.; ARMENGAUD, A.; PELOUX-PETIOT, F.; DELAUNAY, P.; DESPRES, P.; LENGLET, A.; JOURDAIN, F.; LEPARC-GOFFART, I.; CHARLET, F.; et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France. **Euro. Surveill.** v. 15, p. 19676, 2010.

LENNETTE, D.A. **General Principles of laboratory diagnostic methods for viral, rickettsial and chlamydial infections.** In: LENNETTE, E.H., LENNETTE, D.A., LENNETTE, E.T. (eds.). Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Seventh edition, Washington, American Public Health Association, p. 3-25, 1995.

LEONG, A.S., WONG, K., LEONG, T., TAN, P., WANNAKRAIROT, P. The pathology of dengue hemorrhagic fever. **Seminars in Diagnostic Pathology**, n. 24, p. 227-236, 2007.

LIBRATY, D.H., PICHYANGKUL, S., AJARIYAKHAJORN, C., ENDRY, T.P., ENNIS, F.A. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **J. Virol**, n. 75, p. 3501-08, 2001.

LINDENBACH, B.D., RICE, C.M. **Molecular Biology of Flavivirus.** In: CHAMBERS, T.J., MONATH, T.P. (Eds.), Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution. California, **Academic Press**, n. 59, p. 23-61, 2003.

- LINDENBACH, B.D., HEINZ, F.X., RICE, C.M. **Flaviviridae: The Viruses and their Replication**. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. (eds.). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, n. 1, p. 1102-1152, 2007.
- LOREZI, T.F. **Manual de Hematologia: propedeutica e clínica**. 4 ed., Guanabara Koogan, p. 44-144, 2006.
- LUND, J.M., ALEXOPOULOU, L., SATO, A., KAROW, M., ADAMS, N.C., GALE, N.W., IWASAKI, A., FLAVELL, R.A. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 101, p.5598-5603, 2004.
- MALEWICZT, B.; JENKIN, H.M. Development of Dengue Virus Plaques Under Serum-Free Overlay Medium. **journal of Clinical Microbiology**, p. 609-614,1979.
- MARTINEZ, E.T. Fiebre del dengue y dengue hemorrágico em infantes com infecção primaria. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, n. 45, p. 97-102, 1998.
- MARTINEZ, E.T. **Dengue**. Rio de Janeiro, Fiocruz, p. 344, 2005.
- MCBRIDEA, W.J.H., BIELEFELDT-OHMANNB, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and Infection**, n. 2, p. 1041-50, 2000.
- MELLADO-SANCHEZ, G., GARCIA-MACHORRO, J., SANDOVAL-MONTES, C., GUTIERREZ-CASTANEDA, B., ROJO-DOMINGUEZ, A., GARCIA-CARDOSO, J., SANTOS-ARGUMEDO, L., CEDILLO-BARRON, L. A plasmid encoding parts of the dengue virus E and NS1 proteins induces an immune response in a mouse model. **Arch. Virol.**, n. 155, p. 847-856, 2010.
- MILLS, K.H., MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Semin Immunol**, n. 16, p. 107-117, 2004.
- MIZUNO, Y., KOTAKI, A., HARADA, F., TAJIMA, S., KURANE, I., TAKASAKI, T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, n.101, p. 738-739, 2007.
- MONATH, T.P., HEINZ, F.X. **Flaviviruses**. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. (eds.) *Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, p. 961-1034, 1996.
- MONATH, T.M., TSAI, T.P. **Flaviviruses**. In: RICHIMAN, D.D., WHITLEY R.J., HAYDEN, F.G. (eds) *Clinical Virology*. Churchill Livingstone, New York, p. 1133-85, 1997.
- MONATH, T.P., MYERS, G.A., BECK, R.A., KNAUBER M., SCAPPATICCI, K., PULLANO, T., ARCHAMBAULT, W.T., CATALAN, J., MILLER, C., ZHANG, Z. X., SHIN, S., PUGACHEV, K., DRAPER, K., LEVENBOOK, I.S., GUIRAKHOO, F. Safety testing for neurovirulence of novel live, attenuated flavivirus vaccines: infant mice provide an accurate surrogate for the test in monkeys. **Biologicals**, n. 33, p. 131-144, 2005.
- MONTENEGRO, D., LACERDA, H.R., LIRA, T.M., OLIVEIRA, D.S.C., LIMA, A.A.F., GUIMARÃES, M.J.B., VASCONCELOS, P.G. Clinical and Epidemiological Aspects of the Dengue Epidemic in Recife, PE, 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 39, p. 09-13, 2006.

- MURRAY, P.R, ROSENTHAL, K.S., KOBAYASHI, G.S., PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**, 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 604, 2000.
- MURPHY, K. **Imuno Biologia Imunobiologia de Janeway**. 7 ed., Porto Alegre: Artmed editora, p. 795-797, 2010.
- MUSTAFA, A.S., ELBISBISHI, E.A., AGARWAL, R., CHATURVEDI, V.C. Elevated levels of interleukin-13 and IL18 in patients with dengue hemorrhagic fever. **Fems Immunol. Med. Microbiol**, n. 30, p. 229-233, 2001.
- NETO, V.S.G., REBÊLO, J.M.M. Epidemiological Characteristics of Dengue in the Municipality of São Luís, Maranhão, Brazil, 1997-2002. **Cadernos de Saúde Pública**, n. 20, p. 1424-31, 2004.
- NOGUEIRA, R.M.R., MIAGOSTOVICH, M.P., LAMPE, E., SOUZA, R.W., ZAGNE, S.M., SCHATZMAYR, H.G. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 2 serotypes. **Epidemiology and Infection**, n. 111, p. 163-170, 1993.
- NOGUEIRA, R.M.R., MIAGOSTOVICH, M.P., SCHATZMAYR, H.G., MORAES, G.C., CARDOSO, F.M.A., FERREIRA, J., CERQUEIRA, V., PEREIRA, M. Dengue Type 2 Outbreak in the South of the State of Bahia, Brazil: Laboratorial and Epidemiological Studies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 37, p. 507-510, 1995.
- NOISAKRAN, S., PERNG C.G. Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection. **Exp. Biol. Med**, n. 233, p. 401-408, 2008.
- OMATSU, T., MOI, M.L., MIRAYAMA, T., TAKASAKI, S., TAJIMA, S., ITO, M., YOSHIDA, T., SAITO, A., KATAKAI, Y., AKARI, H., KURANE, I. Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. **JGV Papers in Press**, p. 1-36, 2011
- ONLAMOON, N., NOISAKRAN, S., HSIAO, H.M., DUNCAN, A., VILLINGER, F. Dengue virus induced hemorrhage in a nonhuman primate model. **Blood ahead of print**, p. 135-145, 2009.
- OSANAI, C.H., TRAVASSOS DA ROSA, A.P., TANQ, A., do AMARAL, R.S., PASSOS, A.D., TAUIL, P.L. Dengue Outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 25, p. 53-54, 1983.
- OSANAI, C.H. **A Epidemia de dengue em Boa Vista, Território Federal de Roraima, 1981- 1982**. Mestrado (Dissertação em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, Rio de Janeiro 1984.
- OSORIO, J.E., HUANG, C.Y., KINNEY, R.M., Stinchcomb, D.T., Development of DENV ax: Achimeric dengue- 2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection aganst dengue fever. **Vaccine**, n. 29, p. 7251-7260, 2011.
- PACSA, A.S., AGARWAL, R., ELBISHBISHI, E.A., CHATURVEDI, U.C., NAGAR, R., MUSTAFA, A.S. Interleukin-12 in patients with dengue haemorrhagic fever. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, n. 27, 2000.

PAHO. Pan American Health Organization **Dengue and Dengue Hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control**. Washington, Scientific publication, n.548, p. 98, 1994.

PAHO. Organización Pan Americana de la Salud. **Alerta Epidemiológico: Actualización sobre la situación de Dengue em las Américas**. Publicado el 18 de march, 2011.

PAHO. Pan American Health Organization, 2012. Disponível em:
<http://www2.paho.org/bra/index.php?option=com_content&task=view&id=2753&Itemid=463> Acesso em:08/05/2012.

PAYREFITTE, C.N. Dengue virus infection of human microvascular endothelial cell from different vascular bends promotes both comun and specific functional changes. **J. Med. Virol**, n. 78, p. 229-242, 2006.

PINHEIRO, F.P.; CORBER, S.J. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. **PubMed. World Health Stat Q**, n. 50, p. 161-9. 1997.

PINHEIRO, V.C.S., TADEI, W.P., BARROS, P.M.S.S., VASCONCELOS, P.F.C., CRUZ, A.C.R. Detection of Dengue Virus Serotype 3 by Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) Capture in Manaus, Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 100, p. 833-839, 2005.

POLONI, T.R., OLIVEIRA, A.S., ALFONSO, H.L., GALVÃO, L.R., AMARILLA, A.A., POLONI, D.F., FIGUEIREDO, L.T., AQUINO, V. H. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. **Virol J**, n. 27, p. 22, 2010.

RICE, C.M., **Flaviviridae: The viruses and their replication**. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. & Howley, P.M. (eds.) *Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, p. 931-959, 1996.

ROCCO, I.M., KAVAKAMA, B.B., SANTOS, C.L.S. First Isolation of Dengue 3 in Brazil from an Imported Case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 43, p. 55-57, 2001.

RODENHUIS-ZYBERT, I.A., WILSCHUT, J., SMIT, J.M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating Infectivity. **Cell. Mol. Life Sci**, n. 67, p. 2773-2786, 2010.

ROSEN, L.; GUBLER, D.J. The use of mosquitoes to detect and propagate Dengue viruses. **Am J Trop Med Hyg**, v. 23, p.1153-60, 1970.

ROSEN, L. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. Lawrence, n. 26, p. 337-343, 1977.

ROTHMAN, A.L., ENNIS, F.A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, n. 113, p 1-6, 1999.

ROTHMAN, A.L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. The Journal of Clinical Investigation. **Ann Arbor**, n. 113, p. 946-951, 2004.

ROTHMAN, A.L. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 338, p. 83–98, 2010.

ROTHMAN, A.L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature**, v.11, p. 532-543, 2011.

RUDNICK, A., LIM, T.W. Dengue fever studies in Malaysia. **Bulletin from the Institute for Medical Research**, Malaysia (Kuala Lumpur), p. 241, 1986.

RYLANDS, A.B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIRE, R.A.; GROVES, C.P.; RODRIGUES-LIMA, E. An assessment of the diversity of new world primates **Neotropical Primates**,v. 8, n.2, p.61-93, 2000.

SABIN, A.B. Research on dengue during World War II. **Am J Trop Med Hyg**, n. 1, p. 30-50, 1952.

SÁNCHEZ, E.N., DESPRÈS, P., CEDILLO-BARRÓN, L. Innate Immune Responses to Dengue Virus. **Archives of Medical Research**, n. 36, p. 425-435, 2005.

SANGKAWIBHA, N., ROJANASUPHOT, S., AHANDRIK , S., VIRIYAPONGSE, S., JATANASEN, S., SALITUL, V., PHANTHUMCHINDA, B., HALSTEAD, S.B. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. **Am JEpidemiol**, n. 120, p. 652-669, 1984.

SHARPE, R.M., FRASER, H.M., BROUGHAM, M.F.H., MCKINNELL, C., MORRIS, K.D., KELNAR, C.J., WALLACE, W.H., WALKER, M. Role of the neonatal period of pituitary-testicular activity in germ cell proliferation and differentiation in the primate testis. **Hum Reprod**. n. 18, p. 1–8, 2003.

SCHERER, W.F., RUSSELL, P.K., ROSEN, L., CASALS, J., DICKERMAN R.W. Experimental Infection of Chimpanzees with Dengue Viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 3, n. 27, p. 590-599, 1978.

SHOPE, R.E. The use of a microhemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. **Anais de Microbiologia**, n. 11, p. 167-171, 1963.

SHRESTHA, B., BRIEN, J.D., SUKUPOLVI-PETTY, S., AUSTIN, S.K., EDELING, M. A., KIM, T., O'BRIEN, K.M., NELSON, C.A., JOHNSON, S., FREMONT, D.H., DIAMOND, M.S. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. **Plos Pathog**, n. 6, p. 10008-23, 2010.

SCHUL, W., LIU, W., XU, H.Y., FLAMAND, M., VASUDEVAN, S.G. A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs. **J. Infect. Dis**, n. 195, p. 665-674, 2007.

SILVA, L.J., ANGERAMI, R.N. **Dengue**. In: FARHAT, C.K., CARVALHO, L.H.F.R., SUECI R.C.M. *Infectologia Pediátrica e Rodrigo Nogueira*. 3 ed., São Paulo, Atheneu, p. 569-578, 2007.

- SILVA, C.M.B., SILVA, R.B.B., GOMES, M.A.E. **Diagnóstico Laboratorial da Dengue**. In: SOUZA, L.J. Dengue diagnóstico, tratamento e Prevenção, 2ed. Rubio, p.11-35, 2008.
- SILVA JÚNIOR, J.B., PIMENTA JÚNIOR, F.G. **Epidemiologia da dengue**. In: SOUZA, L.J. Dengue diagnóstico, tratamento e Prevenção, 2ed. Rubio, p.11-35, 2008.
- SILVEIRA, A.C.O. **Avaliação de biomarcadores imunológicos associados à terapêutica específica da fase aguda da esquistossomose mansônica humana**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, p. 61-62, 2011.
- SIMMONS, D.; JEREMY, C.P.; FARRAR, J.; NGUYEN VAN VINH CHAU, D.; BRIDGET WILLS, D.M. Dengue. **The new england journal of medicine** T. v.15, p. 135-147, 2012.
- SOUZA, L.J., ZAGNE, S.M.O., SIQUEIRA, E.W.S.S., BASTOS, A.B., GONÇALVES, P.A., ZAGNE, L.O. **Aspetos Clínicos, Manifestações Típicas e Atípicas: Dengue na Gravidez**. In: SOUZA, L.J. Dengue: diagnóstico, tratamento e Prevenção, 2 ed., Rubio, p. 45-65, 2008.
- SUN, W., NISALAK, A., GETTAYACAMIN, M., ECKELS, K.H., PUTNAK, J.R. Protection of Rhesus monkeys against dengue virus challenge after tetravalent live attenuated dengue virus vaccination. **J Infect Dis**, n. 193, p. 1658–1665, 2006.
- TAKEDA, K., AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, n. 16, p. 3-9, 2004.
- TAN, G.K., NG, J.K.W., TRASTI, S.L., SCHUL, W., YIP, G., ALONSO, S. A Non Mouse-Adapted Dengue Virus Strain as a New Model of Severe Dengue Infection in AG129 Mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 4, p. 1-10, 2010.
- TEIXEIRA, M.G., BARRETO, M.L., GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, n. 4, p. 5-33, 1999.
- TEMPORÃO, J.G., PENNA, G.O., CARMO E.H., COELHO G.E., AZEVEDO R.S.S, NUNES, M.R.T., VASCONCELOS, P.F.C Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, n. 5, p. 938-940, 2011.
- TESH, R.B. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. **Am J Trop Med Hyg** . n. 28, p. 1053-1059, 1979.
- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária Uma Introdução**. 8 ed., Furuta, p.140-153, 2009.
- THOISY, B., DE THOISY, B., LACOSTE, V., GERMAIN, A., MUÑOZ-JORDÁN, J., COLÓN, C., MAUFFREY, J.F., DELAVAL, M., CATZEFLIS, F., KAZANJI, M., MATHEUS, S., DUSSART, P., MORVAN, J., SETIÉN, A.A., DEPARIS, X., LAVERGNE, A. Dengue Infection in Neotropical Forest Mammals. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, n. 9, p. 157-170, 2009.
- TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., ROCHA, J.M., SILVA, O.V., LINS, Z.C. Surto de dengue em Boa Vista, Território de Roraima, Brasil. **Boletim Epidemiológico**, Rio de Janeiro, n. 9, p. 93-100, 1982.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; DÉGALLIER, N.; VASCONCELOS, P.F.C.; RODRIGUES, S.G. Os arbovírus no Brasil: generalidades, métodos e técnicas de estudo. **Instituto Evandro Chagas. Documento Técnico Nº 2**, Belém, p. 45, 1994.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; PINHEIRO, F.P., VASCONCELOS, P.F.C. **Arboviroses**. In: Leão RNQ (ed.), Doenças Infecciosas e Parasitárias. Enfoque Amazônico. CEJUP, Belém, p. 207-225, 1997a.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; RODRIGUES, S.G. **Dengue**. Leão RNQ (ed.), In: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Enfoque Amazônico. CEJUP, Belém, p. 227-241, 1997b.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. **Introduction to the species conception virus taxonomy** In: VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARTENS, E.B., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R., WICKNER, R.B. (eds). Virus taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of viruses Academic Express, San Diego, p. 03-16, 2000.

VASCONCELOS, P.F.C., MENEZES, D.B., MELO, L.P., PAULA PESSOA, E.T.F., RODRIGUES, S.G., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., TIMBÓ, M.J., COELHO, I.C.B., MONTENEGRO, F., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., ANDRADE, F.M.O., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. A large epidemic of Dengue Fever with Dengue Hemorrhagic Cases in Ceará state, Brazil, 1994. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 37, p. 253-255, 1995.

VASCONCELOS, P.F.C., LIMA, J.W.O., RAPOSO, M.L., RODRIGUES, S.G., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S., AMORIM, S.M.C., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., MOURA, C.M.P., FONSECA, N., TRAVASSOS DA ROSA, A.M.P. Seroepidemiological survey in São Luis Island, states of Maranhão, Brazil, during a Dengue Fever Epidemics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 32, p. 171-179, 1999.

VASILAKIS, N., WEAVER, S.C. **The History and Evolution of Human Dengue Emergence**. In: MARAMOROSCH, K., SHATKIN, A.J., MURPHY, F.A. (eds.), Advances in Virus Research, California, Academic Press, n. 72, p. 1-76, 2008.

VASILAKIS, N., CARDOSA, J., HANLEY, K.A., HOLMES, E.C., WEAVER, S.C. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health, **Nature**, v.9, p. 532-541, 2011.

VAUGHN, D.W., GREEN, S., KALAYANAROOJ, S., INNIS, B.L., NIMMANNITYA, S., SUNTAYAKORN, S., ROTHMAN, A.L., ENNIS F.A., NISALAK A. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. **J Infect Dis**, n. 176, p. 322-330, 1997.

VORNDAM, V., KUNO, G. **Laboratory diagnosis of dengue virus infections**. In: GUBLER, D.J., KUNO, G. (ed.), Dengue and dengue hemorrhagic fever. CAB International: New York, p. 313-333, 1997.

WEAVER, S.C., VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understand the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, n. 9, p. 523-540, 2009.

WHITBY, K., PIERSON, T.C., GEISS, B., LANE, K., ENGLE, M., ZHOU, Y., DOMS, R.W., DIAMOND, M.S. Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo. **J. Virol.**, n. 79, p. 8698-8706, 2005.

WHO, World Health Organization. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control**. Geneva, p. 54, 1986.

WHO. Dengue Haemorrhagic Fever: **Diagnosis, Treatment, Prevention, and Control**, 2^o edition. Geneva: WHO, p. 87, 1997a.

WHO, World Health Organization. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control**. Geneva, p. 86, 1997b.

WHO, World Health Organization. **Dengue and dengue haemorrhagic fever**. In: WHO Report on global surveillance of epidemic prone infectious diseases. Geneva, p. 345-360, 2001.

WHO, World Health Organization. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**, 2009.

YANG, K.D., YEH, W.T., YANG, M.Y., CHEN, R.F., SHAIQ, M.F. Antibody dependent enhancement of heterotypic dengue infections involved in suppression of IFN gamma production. **J. Med Virology**, n. 63, p. 150-157, 2001.

YAUCH, L.E., SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease. **Antiviral Res**, n. 80(2), p. 87-93, 2008.

YIP, W.C.L. Dengue hemorrhagic fever: current approaches to management. **Medical Progress**, p. 678-689, 1980.

ZAGO, M.A., FALÇÃO, R.P., PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e práticas**. 1 ed., Ateneu, p.1-13, 2004.

ZHENG, Q., FAN, D., GAO, N., CHEN, H., WANG, J., MING, Y., LI, J., AN, J., Evaluation of a DNA vaccine candidate expressing prM-E-NS1 antigens of dengue virus serotype 1 with or without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in immunogenicity and protection. **Vaccine.**, n. 33, p. 763-771, 2011.

ZOMPI, S., SANTICH, B. H., ROBERT BEATTY, P., HARRIS, E. Protection from Secondary Dengue Virus Infection in a Mouse Model Reveals the Role of Serotype Cross-Reactive B and T Cells. **J Immunol**, v. 188, p. 404-416, 2011.

ZOMPI, S., HARRIS, E. Animal Models of Dengue Virus Infection. **Viruses**, n. 4, p. 62-82; 2012.

ANEXO A: CÓPIA DO PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS.



Parecer de Aprovação N° 044/2009/CEPAN/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - N° 0061/2009

Ananindeua/PA, 16 de setembro de 2009.

Projeto: “**Dengue experimental em *Callithrix penicillata***”.

Pesquisador Responsável: PEDRO FERNANDO DA COSTA VASCONCELOS

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,


NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC

ANEXO B: CÓPIA DO PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | |
|--|-----------------------------------|
| Número: 22047-1 | Data da Emissão: 16/06/2010 23:07 |
| Dados do titular | |
| Nome: Pedro Fernando da Costa Vasconcelos | CPF: 103.558.552-91 |
| Título do Projeto: DENGUE EXPERIMENTAL EM CALLITHRIX PENICILLATA | |
| Nome da Instituição: Instituto Evandro Chagas | CNPJ: 00.394.544/0025-52 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|----|--|------------------|---------------|
| 1 | Seleção dos PNH para inclusão no projeto | 01/2010 | 01/2010 |
| 2 | Realização de testes sorológicos nos PNH selecionados para o projeto | 03/2010 | 05/2010 |
| 3 | Inoculação de DENGUE-3 nos PNH e acompanhamento clínico | 06/2010 | 06/2010 |
| 4 | Realização de testes sorológicos com soros de PNH infectados com DENGUE-3 | 06/2010 | 07/2010 |
| 5 | Realização de testes virológicos com soros e fragmentos de vísceras de PNH infectados com DENGUE-3 | 06/2010 | 07/2010 |
| 6 | Realização de exames histopatológicos e imunohistoquímicos em vísceras de PNH infectados c/ DENGUE-3 | 06/2010 | 07/2010 |
| 7 | Realização de exames hematológicos e bioquímicos no sangue dos PNH infectados com DENGUE-3 | 06/2010 | 07/2010 |
| 8 | Inoculação de PNH com DENGUE-2 e acompanhamento clínico | 08/2010 | 08/2010 |
| 9 | Realização de testes virológicos com soros e fragmentos de vísceras de PNH infectados com DENGUE-2 | 08/2010 | 09/2010 |
| 10 | Realização de testes sorológicos com soros de PNH infectados com DENGUE-2 | 08/2010 | 09/2010 |
| 11 | Realização de exames histopatológicos e imunohistoquímicos em vísceras de PNH infectados c/ DENGUE-3 | 08/2010 | 09/2010 |
| 12 | Realização de exames hematológicos e bioquímicos nos soros de PNH infectados com DENGUE-2 | 08/2010 | 09/2010 |
| 13 | Análise dos resultados obtidos e preparação de relatórios e manuscritos científicos p/ publicação | 10/2010 | 03/2011 |

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

| | |
|---|---|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade. |
| 3 | Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação. |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ. |
| 6 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. |
| 7 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade. |
| 8 | As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração. |

Equipe

| # | Nome | Função | CPF | Doc. Identidade | Nacionalidade |
|---|--------------------------------|---|----------------|------------------------|---------------|
| 1 | Helien T. Fuzil | Imunologia | 183.749.498-30 | 238226888 SSP-SP-SP | Brasileira |
| 2 | Manoel Gomes | Análises Clínicas | 132.013.794-68 | 2347661 SEGUP-PA | Brasileira |
| 3 | Márcio Roberto Teixeira Nunes | Análise molecular e Filogenética | 558.405.232-91 | 2252190 SSEGUP-PA | Brasileira |
| 4 | Mana Irma Seixas Duarte | Histopatologia e imunohistoquímica | 107.232.778-34 | 4.610.815-4 SSP/SP-SP | Brasileira |
| 5 | Paulo Henrique Gomes de Castro | Desenvolvimento do experimento e exames dos animais | 251.854.462-34 | 1548771 SSP-PA | Brasileira |
| 6 | Felipe Weissaupt Stegun | Imunopatologia | 353.694.798-01 | 47.745.615-7 SSP/SP-PA | Brasileira |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 92345318



Página 1/3