

DANIELE FREITAS HENRIQUES

**IMUNOPATOLOGIA HEPÁTICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DO VÍRUS
DENGUE EM *Callithrix penicillata***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC

Banca Examinadora: Profa. Dra. Carla Pagliari
Faculdade de Medicina, USP

Profa. Dra. Lívia Carício Martins
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Instituto de Ciências Biológicas, ICB/UFPA

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

Profa. Dra. Daniele Barbosa Medeiros (Suplente)
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC

Belém, 25 de setembro de 2015

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos e amados pais
Fernando e Laura, a minha filha amada
Nalu, que é a fonte de inspiração na
minha vida.*

EPÍGRAFE

“Aplausos, quando os não fundamentam o mérito, afagam certamente a alma e dão algum verniz de celebridade. Mas quem tem vontade e quer fazer, prefere a lição que melhora ao ruído que lisonjeia”.

Machado de Assis

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter guiado a minha vida, colocando sempre em meu caminho pessoas que me ajudaram e ensinaram muito.

Ao meu orientador Dr. Pedro Vasconcelos, pela oportunidade de aprendizado e principalmente pela confiança.

À Dra. Lilian Rose Marques de Sá, por toda a contribuição no desenvolvimento desse projeto, pelo meu treinamento em leitura de lâminas histopatológica hepática de primatas não-humanos e principalmente por aceitar de forma tão generosa colaborar com a minha formação.

À Dra. Carla Pagliari e a Biomédica Luciane Kanashiro, pela padronização do painel de anticorpos utilizados na técnica de imunohistoquímica e pelo treinamento em técnicas de imuno-histoquímica para pesquisa e diagnóstico de agentes infecciosos. Quero especialmente agradecer à Dra. Carla, por todo o tempo despendido as minhas inúmeras dúvidas e pelo incentivo.

A toda equipe do laboratório de disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP. Em especial à Aline Alves de Lima e Wellington Silva que colaboraram na padronização dos anticorpos e à Dra. Maria Irma Seixas Duarte, que possibilitou o meu treinamento, sempre atenciosa despendeu seu tempo para as minhas dúvidas.

À Dra. Livia Casseb, pela ajuda em toda a análise estatística, mas quero agradecer principalmente pela amizade, pelo companheirismo desde o mestrado, pela comidinha deixada no final de semana para eu almoçar enquanto estudava e por tudo mais... Gata, muito obrigada.

À MSc. Larissa Freitas que colaborou com a contagem de alguns anticorpos.

Aos técnicos do laboratório de Patologia do IEC, Sr. Walter Campos, Sr. Orlando Pereira e Lourdes Lima, pela colaboração no preparo dos blocos de parafina, bem como, nas lâminas de imunohistoquímica para detecção de antígenos.

Agradeço à Dra. Marialva Araújo por me ajudar na quantificação dos antígenos virais e Dra. Vera Barros pela colaboração neste projeto.

Ao Dr. Paulo Castro e à Dra. Gilmara Abreu, veterinários responsáveis por toda parte da cinética experimental, muito obrigada.

Às amigas Jannifer Chiang e Lívia Caricio, pela orientação profissional. A vocês, queridas amigas, minha total admiração.

À Universidade Federal do Pará, ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, pelos conhecimentos adquiridos.

Ao Instituto Evandro Chagas pelo incentivo à pesquisa.

A todos os colegas da Seção de Arbovírus/IEC, que direta ou indiretamente possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe da Biblioteca/IEC, que viabilizou a aquisição de diversas fontes bibliográficas.

À Capes, pelo apoio financeiro durante os dois primeiros anos do curso de doutorado BAIP/UFPA.

Aos meus pais Laura e Fernando, que com todo amor e fé depositada nos meus esforços, me ensinaram a ter fé e acreditar em mim. Divido essa conquista com vocês.

A minha filha Nalu, minha companheira, que mesmo sem consciência me apóia incondicionalmente.

À Mariete Brabo, que cuida com muito amor da minha filha, da minha casa e de mim, possibilitando que eu tenha desprendido o tempo necessário para concluir essa tese.

Aos meus irmãos Junior, Vinicius e Marcelo, por serem o meu porto seguro, pelo apoio e incentivo em todas as fases da minha vida. Amor e generosidade são as palavras que definem a nossa relação. Aos meus sobrinhos e minhas cunhadas pelo carinho e aconchego.

A minha amiga-irmã Marcela Bianco, incentivadora de todos os meus projetos, de todas as manhãs, obrigada amiga linda.

Ao meu amado avô João Baptista, por fazer parte constante da minha educação, por sua generosidade e amor empregados a nossa família.

A minha querida avó Laurinda, pela dedicação, mostrando-se sempre interessada e atenciosa com o meu trabalho.

Aos meus tios Eliane e Sérgio, aos meus amados primos Tatiana, Danilo, Laís e Lucas que tiveram participação fundamental nessa conquista.

Aos meus tios Edmundo Palaia e Ana Lúcia, aos meus primos Nathália, Amanda e Luiz Gregório. Sem a generosidade de vocês não teria sido possível alcançar esse objetivo.

A todos os meus tios e primos, pelo incentivo, pela formação pessoal e pelo apoio. Vocês fazem parte do que sou. Muito Obrigada.

À família Ventura, por todo o incentivo, pela amizade, vocês tornaram os meus últimos oito meses de doutorado os mais leves possíveis (e olha que é difícil). Muito Obrigada Sra. Cleide, Sr. Raul, Sra. Maria do Céu, Raul Neto e em especial ao meu querido Gabriel.

As minhas amadas amigas Livia Casseb, Taciana Barbosa, Jannifer Chiang, Daniele Medeiros, Valéria Carvalho e Livia Caricio pela amizade, pelas orações, pelo incentivo, pela colaboração a este trabalho. Amigas se eu nunca pensei em desistir desse sonho, foi porque vocês estavam ao meu lado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. CLASSIFICAÇÃO DA DENGUE.....	17
1.2. ETIOLOGIA, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E REPLICAÇÃO.....	18
1.3. EPIDEMIOLOGIA.....	21
1.3.1. Dengue nas Américas.....	22
1.3.2. Dengue no Brasil.....	24
1.4. IMUNOPATOGENIA DA DENGUE.....	26
1.5. FISIOPATOLOGIA.....	29
1.6. PATOLOGIA.....	32
1.7. FÍGADO.....	34
1.7.1. Histofisiologia do fígado.....	34
1.7.2. Funções imunológicas do fígado e características das hepatites virais.....	38
1.8. MODELO ANIMAL PARA INFECÇÃO PELO VDEN.....	40
1.9. O GÊNERO CALLITHRIX.....	42
1.10. RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	43
1.11. OBJETIVOS.....	44
1.11.1. Objetivo Geral.....	44

1.11.2.	Objetivos Especificos	45
2.	MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1.	AMOSTRAS E ESTOQUE VIRAL.....	46
2.2.	PRIMATAS NÃO HUMANOS.....	47
2.2.1.	Aspectos Éticos	48
2.2.2.	Critérios de Inclusão e Exclusão	48
2.2.3.	Calitricídeos Seleccionados	49
2.3.	CINÉTICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	49
2.3.1.	Infecção Primária	49
2.3.2.	Infecção Secundária	50
2.4.	CONFIRMAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO.....	51
2.5	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO.....	51
2.6.	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	54
2.6.1.	Análise da resposta imune no fígado	54
2.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
3.	RESULTADOS	59
3.1.	DETECÇÃO DE ANTÍGENO VIRAL.....	59
3.2.	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	60
3.2.1.	Descrição histopatológica	60
3.2.1.1.	Fase aguda da Infecção primária (Ag.1).....	60
3.2.1.2.	Fase Convalescente da Infecção primária (Conv.1).....	61
3.2.1.3.	Animal Sentinela 1.....	61

3.2.1.4.	Fase aguda da Infecção secundária (Ag.2).....	61
3.2.1.5.	Fase Convalescente da Infecção secundária (Conv.2).....	62
3.2.1.6.	Animal Sentinela 2.....	62
3.2.2.	Análise Estatística.....	65
3.2.2.1.	Infecção Primária.....	65
3.2.2.2.	Infecção Secundária.....	67
3.2.2.3.	Comparações entre a Infecções Primária e Secundária.....	69
3.3.	ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE.....	71
3.3.1.	Imunomarcção para macrófago.....	74
3.3.1.1.	Imuno-expressão acinar.....	74
3.3.1.2.	Imuno-expressão nos EP.....	74
3.3.1.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	75
3.3.2.	Imunomarcção para células Matadoras Naturais (NK).....	75
3.3.2.1.	Imuno-expressão acinar.....	75
3.3.2.2.	Imuno-expressão nos EP.....	75
3.3.2.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	76
3.3.3.	Imunomarcção para células Apresentadoras de Antígenos (APC).....	76
3.3.3.1.	Imuno-expressão acinar.....	76
3.3.3.2.	Imuno-expressão nos EP.....	76
3.3.3.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	77
3.3.4.	Imunomarcção para Linfócitos T auxiliares (CD4+).....	77
3.3.4.1.	Imuno-expressão acinar.....	77

3.3.4.2.	Imuno-expressão nos EP.....	77
3.3.4.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	78
3.3.5.	Imunomarcção para Linfócitos B (CD20).....	78
3.3.5.1.	Imuno-expressão acinar.....	78
3.3.5.2.	Imuno-expressão nos EP.....	78
3.3.5.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	79
3.3.6.	Imunomarcção para Fas/APO-1 (CD95).....	79
3.3.6.1.	Imuno-expressão acinar.....	79
3.3.6.2.	Imuno-expressão nos EP.....	80
3.3.6.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	80
3.3.7.	Imunomarcção para IFN-γ.....	83
3.3.7.1.	Imuno-expressão acinar.....	83
3.3.7.2.	Imuno-expressão nos EP.....	83
3.3.7.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	84
3.3.8.	Imunomarcção para TNF-α.....	84
3.3.8.1.	Imuno-expressão acinar.....	84
3.3.8.2.	Imuno-expressão nos EP.....	85
3.3.8.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	85
3.3.9.	Imunomarcção para IL-8.....	85
3.3.9.1.	Imuno-expressão acinar.....	85
3.3.9.2.	Imuno-expressão nos EP.....	86
3.3.9.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	86

3.3.10.	Imunomarcção para TGF-β.....	86
3.3.10.1.	Imuno-expressão acinar.....	86
3.3.10.2.	Imuno-expressão nos EP.....	87
3.3.10.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	87
3.3.11.	Imunomarcção para IL-10.....	87
3.3.11.1.	Imuno-expressão acinar.....	87
3.3.11.2.	Imuno-expressão nos EP.....	88
3.3.11.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	88
3.3.12.	Imunomarcção para molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM).....	89
3.3.12.1.	Imuno-expressão acinar.....	89
3.3.12.2.	Imuno-expressão nos EP.....	89
3.3.12.3.	Imuno-expressão nas VHC.....	90
4.	DISCUSSÃO.....	93
5.	CONCLUSÃO.....	111
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
	APÊNDICE A.....	130
	APÊNDICE B.....	131
	APÊNDICE C.....	132
	APÊNDICE D.....	133
	APÊNDICE E.....	134

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	Página
Tabela 1 - Avaliação imuno-histoquímica - média e desvio padrão do número de células positivas/mm ² no ácino por grupos.....	72
Tabela 2 - Avaliação imuno-histoquímica - média e desvio padrão do número de células positivas no EP por grupos.....	73
Tabela 3 - Avaliação imuno-histoquímica - média e desvio padrão do número de células positivas na VHC por grupos.....	73
Quadro 1 - Amostras virais selecionadas para inoculação sequencial em PNH.....	46
Quadro 2 - Parâmetros e caracterização dos escores utilizados para a análise morfológica do fígado utilizando coloração de HE, Perls, Picrossírius e Reticulina.....	52
Quadro 3 - Alterações histológicas com escores específicos de acordo com a importância patológica.....	54
Quadro 4 - Painel de anticorpos e sistema de detecção utilizados nas reações de imuno-histoquímica em fígados de saguis.....	56
Quadro 5 - Semi-quantificação de antígenos do VDEN em fígado dos primatas em estudo.....	59

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema da estrutura dos <i>Flavivirus</i> : vírus maduro.....	19
Figura 2 - Esquema da organização do genoma dos <i>Flavivirus</i>	20
Figura 3 - Números de casos de FD e FHD, nas Américas, 1980-2007.....	23
Figura 4 - Números de casos notificados e hospitalizações, devido FHD, Brasil, 1986-2002.....	25
Figura 5 - Mecanismo de neutralização do VDEN por anticorpos e facilitação da penetração do vírus por anticorpos em monócitos.....	29
Figura 6 - Organização do ácino hepático.....	35
Figura 7 - Arquitetura do parênquima hepático. Representados por um lóbulo hexagonal com o ácino dividido por zonas.....	36
Figura 8 - PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i>	47
Figura 9 - Imunohistoquímica em cortes de fígado de PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i>	60
Figura 10 - Fotomicrografia do fígado de PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados com VDEN, HE.....	63
Figura 11 - Fotomicrografia do fígado de PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados com VDEN, HE.....	64
Figura 12 - Semiquantificação das alterações do fígado durante as fases da infecção primária.....	65
Figura 13 - Semiquantificação das alterações no fígado de PNH durante a cinética da infecção primária.....	67
Figura 14 - Semiquantificação das alterações do fígado durante as fases da infecção secundária.....	68
Figura 15 - Semiquantificação das alterações no fígado de PNH durante a cinética da infecção secundária.....	69
Figura 16 - Semiquantificação da lesão hepática durante as fases da infecção primária e infecção secundária.....	70
Figura 17 - Caracterização de hepatite nas fases da infecção primária e infecção secundária.....	71
Figura 18 - Fotomicrografia do fígado de PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados com VDEN, IHQ.....	81
Figura 19 - Imuno-expressão acinar de Lisozima, NK, S100, CD4, CD20 e CD95 por fases da infecção primária, secundária e animais sentinelas.....	82
Figura 20 - Fotomicrografia do fígado de PNH da espécie <i>Callithrix penicillata</i> infectados com VDEN, IHQ.....	91
Figura 21 - Imuno-expressão acinar de IFN- γ , TNF- α , IL-8, TGF- β , IL-10 e VCAM por fases da infecção primária, secundária e animais sentinelas.....	92

RESUMO

A Dengue constitui um dos principais problemas de Saúde Pública no mundo, e um dos fatores que colaboram com esta situação é a falta de uma vacina eficaz contra a doença, sendo que em parte, essa dificuldade para obtenção, se deve à inexistência de um modelo experimental que represente o quadro de infecção e manifestação da doença similar aos observados em humanos. Dessa forma, o Instituto Evandro Chagas demonstrou a presença de antígenos virais de dengue, através do teste de Imuno-histoquímica, em primata não humano (PNH) da espécie *Callithrix jacchus*, o qual evoluiu a óbito com quadro de dengue hemorrágica. Diante do exposto, aliados ao fato de que o fígado é o órgão onde se observa as principais alterações provocadas pelo *Virus Dengue* (VDEN) em humanos, torna-se importante analisar o fígado de primatas do gênero *Callithrix* a fim de estudar a patogênese e a imunopatologia da infecção sequencial pelo VDEN. No total, 26 PNH da espécie *Callithrix penicillata* foram submetidos a infecção primária (IP) por via subcutânea com VDEN-3 ($3,23 \times 10^3$ PFU/mL), sendo 13 destes animais anestesiados e sacrificados diariamente por sete dias pós-infecção (dpi) (fase aguda) e em intervalos aleatórios até 60 dpi (fase convalescente); a infecção secundária (IS) com VDEN-2 ($4,47 \times 10^4$ PFU/mL) foi realizada dois meses após a IP nos demais 13 animais. Animais sentinelas não infectados foram reservados até o final do experimento. O fígado dos animais foram processados para histopatologia e imuno-histoquímica usando anticorpos policlonais para VDEN e anticorpos para análises da resposta imune inata, celular e citocínica. Os PNH estudados foram suscetíveis à replicação sequencial do VDEN-3 e VDEN-2 no fígado, havendo expressão de antígenos virais em hepatócitos, células de Kupffer e nos corpúsculos de Councilman; o comprometimento histopatológico do fígado foi caracterizado por: presença de apoptose; focos de necrose lítica; esteatose; tumefação celular; inflamação acinar, no espaço porta (EP) e na veia hepática central (VHC); hiperplasia/hipertrofia em células de Kupffer, bem como, hemossiderina em células de Kupffer; e dilatação dos sinusóides. A intensidade da lesão hepática foi proeminente na fase aguda da IP e IS, apresentando discreta hepatite aguda. A apoptose foi a forma predominante de morte em hepatócitos; bem como, necrose lítica e o infiltrado inflamatório apresentaram padrão de distribuição predominante em Z2. Observou-se aumento na expressão acinar de macrófagos ativados, células NK, proteína S-100 e linfócitos B durante as fases da IP e IS; houve ainda, aumento da expressão acinar de linfócitos TCD4+ durante a fase aguda da IP; observou-se aumento na expressão acinar de IFN- γ durante as fases da IP e IS, TNF- α e IL-8 com maior prevalência na IS, TGF- β e IL-10 mais expressas na fase aguda da IP, proteína Fas durante a fase aguda da IP e IS e VCAM na fase aguda da IS e aumento na expressão nos EP. Esses achados foram semelhantes aos observados em fígados de casos fatais de dengue em humanos, porém com intensidade e amplitude menor, sugerindo que PNH da espécie *Callithrix penicillata* é um bom modelo experimental para o estudo da infecção pelo VDEN, especialmente os aspectos imunopatológicos.

ABSTRACT

Dengue is one of most important public health problem in the world, and one of the factors that contribute with this situation is the lack of an effective vaccine against the disease, and in part, this difficulty to obtain is due clinical the lack of an experimental model that mimic the infection and manifestation of the disease as those observed in humans. Then, the Evandro Chagas Institute showed the presence of dengue antigens using the Immunohistochemistry assay, in the liver of a non-human primate (NHP) of the species *Callithrix jacchus*, with a fatal outcome following dengue hemorrhagic fever. Based in the above considerations and in addition to the fact that the liver is the targetb organ for Dengue Virus (DENV) in humans, it is important to analyze the liver of primates of the genus *Callithrix* in order to study the pathogenesis and the immunopathology of sequential infection by DENV. A total of 26 NHP *Callithrix penicillata* were submitted to primary infection (PI) subcutaneously with DENV-3 (3.23×10^3 PFU/mL), and 13 of these animals anesthetized and sacrificed daily for seven days post-infection (dpi) (acute phase) and in random intervals until 60 dpi (convalescent phase); the secondary infection (SI) with DENV-2 (4.47×10^4 PFU/mL) was performed two months after the PI in the remaining 13 animals. Uninfected sentinels animals were reserved up ending of the experiment. The liver of the animals were processed for histopathology and Immunohistochemical assay using polyclonal antibodies to DENV and antibodies for analyses of the innate and cellular immune response as well as the cytokine expression . The NHP were susceptible to sequential infection by DENV-3 and DENV-2; in the liver viral antigens were expressed in hepatocytes, Kupffer cells and Councilman bodies; the histopathological changes in liver was characterized by the presence of apoptosis, focal lytic necrosis, steatosis, swelling cellular, inflammation (acinar, EP and HCV), hyperplasia/hypertrophy in Kupffer cells, hemosiderin in Kupffer cells and **sinusoidal dilatation**; the intensity of the liver damage was prominent in the acute phase of PI and SI resulting in acute hepatitis. In addition the apoptosis was the most frequent mechanism of death of hepatocytes; lytic necrosis and inflammatory infiltrate showed predominant distribution pattern in Z2. An increase of the acinar expression of activated macrophages, NK cells, S-100 protein and B-lymphocytes during the stages of PI and SI; as well as, increased acinar expression of TCD4 + lymphocytes during the acute phase of PI; as to the quantification of cytokines and molecules, was observed an increase in acinar expression of: IFN- γ during the stages of PI and SI, TNF- α and IL-8 with higher prevalence in SI, TGF- β and IL-10 with prevalence in acute phase of PI, Fas protein during the acute phase of PI and SI and VCAM in acute phase of SI, as well as increase in expression in the EP. These findings were similar to those observed in livers from fatal cases of dengue fever in humans, but with lower intensity and amplitude, thus indicating that NHP *Callithrix penicillata* species is a good experimental model for infection by DENV, involving immunopathologic studies.

1 INTRODUÇÃO

A Dengue é uma doença infecciosa não contagiosa, causada pelo vírus dengue (VDEN), que compreende quatro tipos virais (sorotipos) distintos: VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 e VDEN-4. Transmite-se, principalmente, por mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, cuja adaptação e difusão desse vetor permitiram a introdução do vírus em muitos países (Vasconcelos *et al.*, 2013).

É a arbovirose mais distribuída no mundo e a mais importante virose em termos de morbidade e mortalidade, com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) de ocorrerem anualmente em todo o mundo cerca de 50-100 milhões de casos de infecções por Dengue, sendo 500.000 por Dengue grave e 2,5% das pessoas afetadas morrem (WHO, 2013). Entretanto esses números foram recentemente revistos, e as estimativas atuais indicam a ocorrência anual de 390 milhões de infecções por dengue, 96 milhões das quais com sintomatologia (Bhatt *et al.*, 2013).

1.1 CLASSIFICAÇÃO DA DENGUE

Alterações na epidemiologia da dengue levaram a problemas na utilização da antiga classificação da dengue (OMS, 2007); desta forma, após estudo clínico prospectivo em áreas endêmica de dengue, a OMS conseguiu recolher evidências para uma nova classificação da dengue por níveis de gravidade, definindo em duas categorias: dengue (sem ou com sinais de alarme) e dengue grave (WHO, 2009).

Nos critérios para o diagnóstico de dengue (sem sinais de alarme) a pessoa suspeita precisa viver ou ter viajado nos últimos 14 dias para área onde esteja ocorrendo transmissão de dengue, além de apresentar febre com duração de dois a sete dias, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas/sinais: náusea, vômitos, cefaléia, prostração, dor retroorbitária, artralgia, mialgia, exantema, petéquias ou prova do laço positiva e leucopenia (WHO, 2009).

A fase aguda da dengue costuma durar de três a sete dias, embora possa estender-se por até dez dias; após esse período, com a defervescência da febre segue a fase de convalescência que pode prolongar-se por várias semanas, com grande debilidade física, certo grau de apatia e, em alguns casos, distúrbios do paladar (Torres, 2005).

É considerado dengue com sinais de alarme todo o caso de dengue que, no período de defervescência da febre apresenta um ou mais dos seguintes sinais/sintomas: dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdômen; vômitos persistentes; acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico); sangramento de mucosas; letargia ou irritabilidade; hipotensão postural (lipotímia); hepatomegalia maior do que 2 cm; e aumento progressivo do hematócrito (WHO, 2009).

A dengue grave é caracterizada por todo caso de dengue que apresente um ou mais das seguintes manifestações clínicas: (1) grave extravasamento plasmático levando ao choque, evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar igual ou maior a três segundos, pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente ≤ 20 mm Hg, hipotensão arterial em fase tardia, acumulação de líquidos com insuficiência respiratória; (2) sangramento grave segundo a avaliação do médico (hematêmese, melena, metrorragia volumosa, sangramento do sistema nervoso central, entre outros); (3) comprometimento grave de órgãos, tais como, dano hepático (Aspartato aminotransferase-AST ou Alanina aminotransferase-ALT ≥ 1000), dano no sistema nervoso central (alterações da consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos (WHO, 2009).

Dengue é uma doença com diferentes apresentações clínicas e muitas vezes com evolução imprevisível, portanto, é importante saber que mesmo pacientes com dengue sem sinais de alerta podem desenvolver dengue grave (WHO, 2009).

O Brasil adotou a nova classificação para dengue em janeiro de 2014, apesar da mudança na classificação ter sido estabelecida em 2009, a classificação anterior continua a ser amplamente usada, tendo em vista a adaptação para o uso da nova classificação e os trabalhos gerados anteriormente à mudança, o presente estudo, quando necessário, citará a classificação antiga que segue adiante: dengue Clássica (DC) e febre hemorrágica por dengue (FHD); esta última pode ou não evoluir para síndrome de choque por dengue (SCD) (WHO, 2007).

1.2 ETIOLOGIA, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E REPLICAÇÃO

Os quatro sorotipos do VDENV, pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que incluem 53 espécies virais registradas, tendo como protótipo, o vírus

da febre amarela (VFA). Os quatro sorotipos virais formam um subgrupo no gênero *Flavivirus* denominado dengue (ICTV, 2012).

As partículas virais do VDEN, bem como dos demais integrantes do gênero *Flavivirus* apresentam forma esférica, medindo aproximadamente 50 nm de diâmetro, sendo envoltas por um envelope de natureza lipoprotéica. O capsídeo é composto de uma única proteína (C) e o envelope contém duas proteínas de membrana, as proteínas E e M (Lindenbach & Rice, 2003) (Figura 1). O genoma dos flavivírus consiste de uma fita simples de RNA, não segmentado, de polaridade positiva, que apresenta uma única cadeia aberta de leitura (“Open Reading Frame”-ORF), flanqueada por duas regiões não codificadoras (RNC) situadas nos terminais 5’ e 3’. A poliproteína codificada é pré e pós-traducionalmente clivada em dez proteínas virais, sendo três estruturais (C, PrM e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Lindenbach & Rice, 2003) (Figura 2).

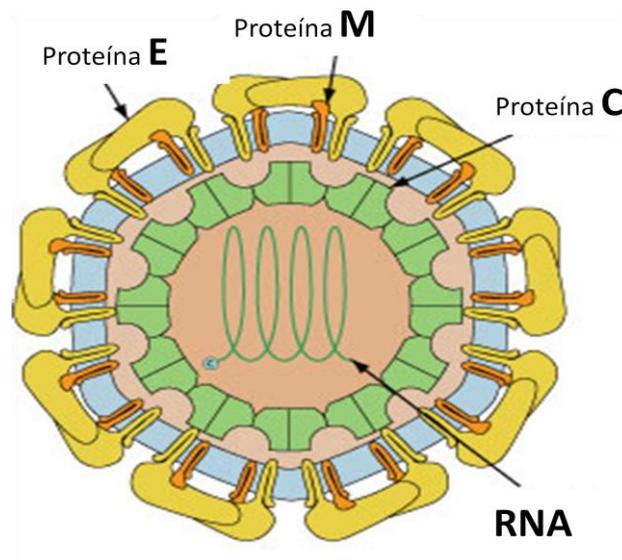


Figura 1- Esquema da estrutura dos *Flavivirus*: vírus maduro.

Fonte: Van Regenmortel et al., 2000.



Figura 2- Esquema da organização do genoma dos Flavivirus.
 Fonte: Rice et al., 1985.

O VDEN se liga aos receptores da superfície celular (estes não foram completamente caracterizados) e são internalizados por endocitose. A entrada do VDEN em célula susceptível também pode ocorrer através da interação da proteína E com receptores celulares ou pela opsonização da partícula viral por anticorpos, sendo internalizados via receptores Fc. A acidificação da vesícula endocítica leva ao rearranjo da glicoproteína de envelope (E), que permite a fusão do envelope viral com a membrana da vesícula. Após a fusão o conteúdo do nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e sofre ação de enzimas celulares expondo o genoma viral (Rothman, 2011; Acosta *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008).

O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que, posteriormente, é clivada pelas proteases das células hospedeiras e proteinases serinas virais (NS2B-NS3), para dar origem às proteínas estruturais e proteínas não-estruturais no retículo endoplasmático (RE) no citoplasma, sendo iniciada a produção das mesmas por um peptídeo-sinal e terminada por sequências de parada (*stop codon*) (ICTV, 2012; Lindenbach & Rice, 2003).

A replicação do RNA ocorre na membrana do retículo endoplasmático (RE) perinuclear, através da síntese da fita negativa complementar, a qual é usada então como molde para produção adicional do genoma viral (fita RNA positiva). Este é sintetizado por um mecanismo semiconservativo envolvendo replicação intermediada (contendo híbridos de fita dupla de RNA originada de fita simples) e formas de replicação. As sínteses do molde negativo, nas células infectadas continuam através do ciclo de replicação (Santos *et al.*, 2008; Lindenbach & Rice, 2003).

Partículas virais podem ser, primeiramente, observadas dentro do RE rugoso, o qual se acredita ser o primeiro sítio de montagem. Os vírions imaturos são transportados para o sistema de membrana excretório da célula hospedeira (complexo de Golgi), seguindo para a superfície celular onde ocorre a exocitose. Após a exocitose, já no meio extracelular, a proteína prM é clivada por uma protease celular furina ou similar à furina, para a formação das partículas maduras contendo a proteína M (ICTV, 2012; Lindenbach & Rice, 2003).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

O ciclo biológico do VDEN é simples e envolve o vetor artrópode e hospedeiro vertebrado susceptível, que portanto, dentro de um critério epidemiológico define o VDEN, como arbovírus (*arthropod-borne virus*). A transmissão do VDEN ocorre por fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* (*Ae.*) que se infectam após realizarem repasto sanguíneo em indivíduos virêmicos e transferem, após um período de incubação extrínseco, durante novo repasto, os vírus ao novo hospedeiro humano susceptível através de picada infectante (Fonseca & Figueiredo, 2005; Silva & Angerami, 2007).

A fonte de infecção e o hospedeiro vertebrado primário do VDEN é o ser humano (Silva Jr & Pimenta Jr, 2008). Porém foi descrito na Ásia e na África um ciclo silvestre envolvendo mosquito da copa de árvores *Aedes* (*Finlaya*) *niveus* e macacos (Guzman & Koury, 2002). Esses ciclos silvestres do Dengue têm sido registrados, mas a importância desses ciclos na manutenção e dispersão do VDEN permanece ainda sem ser demonstrada (Whitehead *et al.*, 2007). Além disso, os hospedeiros descritos, os macacos do Velho Mundo, têm apresentado resistência ao vírus, sendo que sequer adoecem. Recentemente, Thoisy *et al.* (2009) descreveram a identificação do VDEN em diversos grupos de animais na Guiana Francesa, mas o significado de tais dados ainda requer cuidado na interpretação, pois sempre se soube que aves, roedores, marsupiais, etc., são refratários aos sorotipos do VDEN.

Outra forma importante de transmissão que ocorre entre os mosquitos é a transovariana (vertical). Estudos tem demonstrado ser possível esse tipo de transmissão no laboratório e em natureza, a evidência desse tipo de transmissão explica como o vírus sobrevive aos períodos secos e frios (Rosen *et al.*, 1983; Gunther *et al.*, 2007).

O mosquito *Ae.* da espécie *aegypti* é, sem dúvida, o mais importante vetor do VDEN, devido à sua antropofilia e sua estreita relação com o ser humano que o torna um mosquito essencialmente urbano-doméstico (Kyle & Harris, 2008). O *Ae. aegypti* é uma espécie das regiões tropicais e subtropicais, mas com uma capacidade ecológica bastante ampla. Pode ser encontrado geralmente, entre as latitudes 35° N e 35° S, o que corresponde à isoterma de inverno de 10° C, mas já foi encontrado na latitude 45° N (Nelson, 1986). Há influência da temperatura na transmissão do VDEN, pois a temperatura interfere na atividade de repasto sanguíneo das fêmeas dos mosquitos, em sua longevidade e no período de incubação extrínseco do vírus (Glasser & Donalísio, 2002).

A distribuição do *Ae. aegypti* também é restrita à altitude, não sendo usualmente encontrado em altitudes acima de 1.000 metros. Entretanto, o mosquito já foi localizado a mais de 2.000 metros acima do nível do mar, como na Índia e na Colômbia, sendo a temperatura média anual nesses países de 17° C (OPS, 1995).

O *Ae. albopictus* é o vetor secundário do VDEN no sudeste da Ásia, mas tem sido documentado como vetor exclusivo durante algumas epidemias de Dengue. De fato, em Bangladesh oc

orreu surto em área urbana que foi associado ao *Ae. albopictus*, e em algumas áreas rurais da Indonésia tem ocorrido surtos, onde essa espécie é predominante (Jumali *et al.*, 1979; Ali *et al.*, 2003).

Nas Américas, o *Ae. albopictus* ainda não foi apontado de maneira consistente como vetor do VDEN, embora alguns estudos tenham encontrado mosquitos naturalmente infectados (Serufo *et al.*, 1993; Ibañez-Bernal *et al.*, 1997).

1.3.1. Dengue nas Américas

O VDEN circulou desde o século XIX até as primeiras décadas do século XX nas Américas. Após um silêncio epidemiológico, foi isolado o VDEN-2 na região de Trinidad, em 1953-1954, em uma situação não-epidêmica. A primeira epidemia de Dengue clássica das Américas foi documentada na costa do Caribe e na Venezuela, em 1963 e 1964, relacionada com o sorotipo VDEN-3 (Gluber, 1987).

No começo da década de 1970, a Colômbia foi afetada por epidemias associadas aos sorotipos VDEN-2 e VDEN-3. O VDEN-1 foi introduzido nas Américas em 1977, causando uma epidemia que começou na Jamaica, expandiu-se

para Cuba, Porto Rico e Venezuela, Caribe, México e outros países da América do Norte e do Sul, com a notificação de cerca de 700 mil casos de Dengue durante o período de 1977-1980 (OPS, 1995; Martín *et al.*, 2010).

Foi descrito em Cuba, em 1981, a primeira epidemia de FHD/SCD nas Américas, causada pelo VDEN-2, tendo sido notificados 344.203 casos, com 116.143 hospitalizações e 158 óbitos, dos quais 101 eram de crianças. Durante o mesmo ano, o VDEN-4 foi introduzido nas ilhas do Caribe oriental, depois esse sorotipo expandiu-se para o resto do Caribe, América Central e do Sul e México (Pinheiro & Corber, 1997; Kouri *et al.*, 1986). Em 1989, uma segunda epidemia de FHD foi relatada na Venezuela. Sorotipos VDEN-1, 2 e 3 foram isolados, com predominância do VDEN-2 (OPAS, 1990).

Hoje, os quatro sorotipos estão circulando em quase todos os países endêmicos nas Américas; o modelo epidemiológico desta enfermidade tem evoluído nas Américas da mesma maneira como ocorreu nos anos da década de 1950 na Ásia. A Dengue causou surtos esporadicamente por vários anos, culminando com epidemias graves. Ciclos epidêmicos foram observados a cada 3-5 anos com um aumento na frequência de casos de FDH e de casos fatais causado pela Dengue principalmente durante os anos com maior número de casos (figura 3) (Martín *et al.*, 2010).

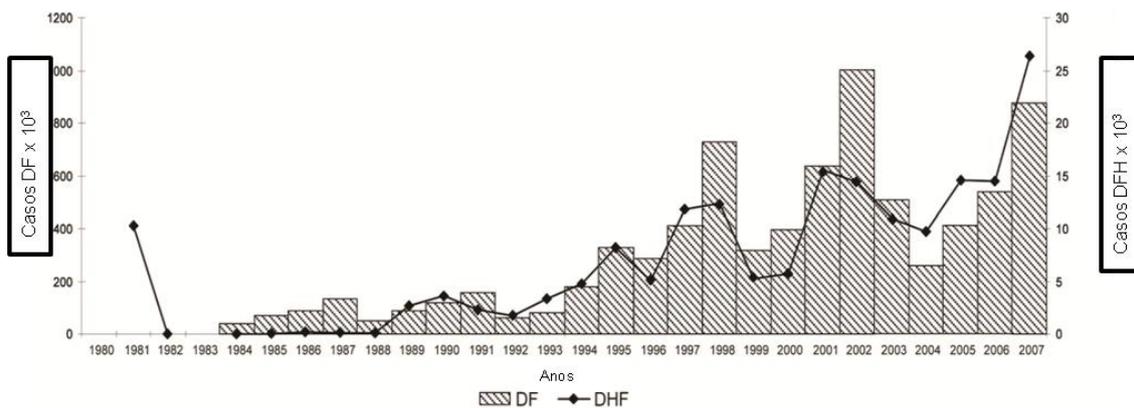


Figura 3- Números de casos de FD e FHD, nas Américas, 1980-2007.
Fonte: MARTÍN *et al.*, 2010.

1.3.2. Dengue no Brasil

No Brasil, no período compreendido entre 1982 e 2008, cerca de 8 milhões de casos de FD foram notificados, com aproximadamente 10.000 casos de FHD e cerca de 3.000 óbitos registrados. A tendência da Dengue no Brasil é de grandes epidemias anuais com notificação nos últimos anos de mais de um milhão de casos, intercalado de 3-5 anos com menor número de casos, mas com notificações que variam de 500-800 mil casos, o que representa cerca de 60 a 80% de todas as notificações de dengue que ocorrem nas Américas todos os anos (Brasil, 2009).

A dispersão da Dengue no Brasil, tem resultado em aumento a cada ano do número de municípios infectados com Dengue e a ocorrência em áreas remotas de pequenos municípios em todas as regiões, o que resultou na interiorização do Dengue no Brasil. Essa interiorização permitiu que áreas peri - urbanas e rurais sofressem surtos de Dengue. Também, esse fato, facilitou o contato dos transmissores e do vírus com animais selvagens (Vasconcelos *et al.*, 1999; Siqueira *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2003; 2007).

No Brasil, o primeiro surto de Dengue confirmado laboratorialmente foi em 1981-1982, no estado de Roraima. Este surto foi causado pelos sorotipos VDEN-1 e VDEN-4, com predominância deste último (Osanai *et al.*, 1984). A transmissão da Dengue foi restrita a Roraima, com nenhum outro relato de detecção de Dengue até 1986 quando ocorreu a introdução do VDEN-1 no Rio de Janeiro, disseminando-se para outros seis estados (Osanai *et al.*, 1983; Schartzmayr *et al.*, 1986).

Em 1990, o sorotipo VDEN-2 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro, seguido por disseminação para outras regiões do país, com apresentações clínicas mais graves e os primeiros casos fatais associados à infecção sequencial por dengue (Nogueira *et al.*, 1993; Vasconcelos *et al.*, 1995). O sorotipo VDEN-3 foi notificado pela primeira vez, em 2000, no Rio de Janeiro; apesar deste vírus ser o sorotipo predominante nesta epidemia, e o único associado aos óbitos, os sorotipos VDEN-1 e VDEN-2 também estavam circulando simultaneamente com o VDEN-3 (Nogueira *et al.*, 2005).

O VDEN-2 voltou a causar epidemias no Brasil iniciando pelo Rio de Janeiro, em 2007 e 2008, com a notificação de um número impressionante de casos fatais por Dengue (MS, 2009). Esses dados sugerem que a infecção prévia por Dengue pode preparar o terreno para uma infecção com maior número de mortes por um

sorotipo diferente em um prazo de poucos anos (Thein *et al.*, 1997; Graham *et al.*, 1999).

Outros estudos dão suporte para esta hipótese. De fato, os primeiros casos de FHD no Brasil, foram confirmados em 1990 com a introdução do VDEN-2, sendo que, quatro anos antes foi notificada a circulação do sorotipo VDEN-1. Assim o impressionante aumento no número de casos de FHD, observado em 2002-2003, após introdução do sorotipo DEN-3, em 2000 no Brasil (figura 4) era esperado e confirma a hipótese do aumento da gravidade pelas infecções sequenciais (Siqueira Jr. *et al.*, 2005; Halstead, 1981).

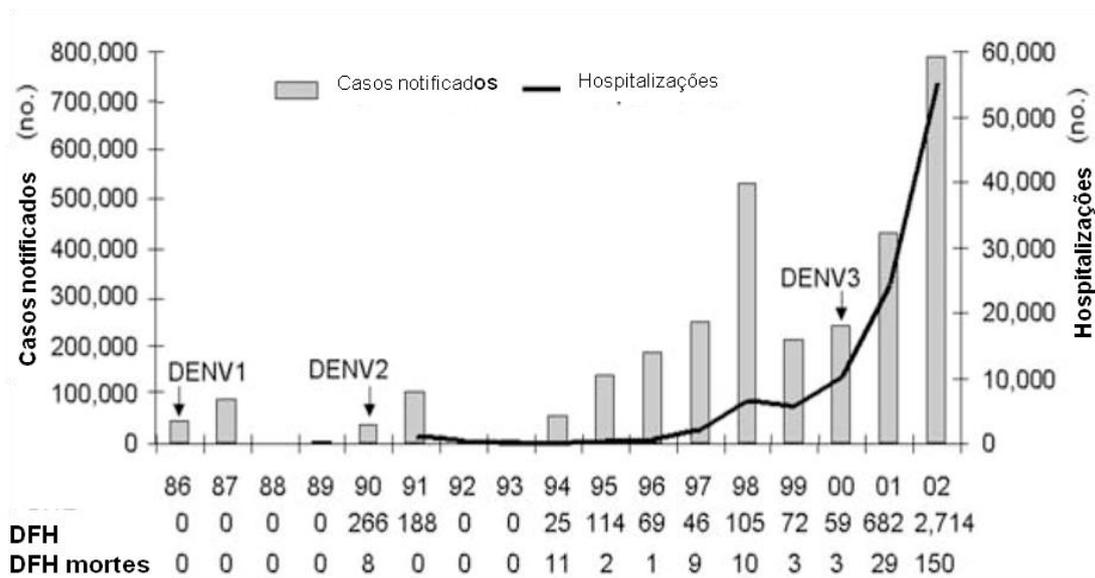


Figura 4- Números de casos notificados e hospitalizações, devido FHD, Brasil, 1986-2002. As setas indicam o ano de introdução dos sorotipos de VDEN no Brasil. Fonte: Siqueira e colaboradores, 2005.

Em 2010, foi notificado a reemergência do VDEN-4 em Boa Vista, capital de Roraima, após uma ausência de 28 anos. Além da circulação desse sorotipo, foi detectado circulação dos sorotipos VDEN-1 e VDEN-2 simultaneamente, sendo relatado um aumento de 154% de casos notificados de dengue em Boa Vista, entre FD e FHD, quando comparados ao ano de 2009 (Temporão, *et al.*, 2011). Atualmente, esse sorotipo já está circulando em outros estados brasileiros, e um estudo molecular realizado recentemente, com isolados virais de vários estados das regiões norte e nordeste, demonstrou que a reintrodução do VDEN-4 foi feita por

múltiplas entradas do VDENV-4 nos estados de Roraima, Amazonas, Pará e Bahia (Nunes *et al.*, 2012).

1.4 IMUNOPATOGENIA DA DENGUE

Após a inoculação no hospedeiro vertebrado do VDENV através da picada infectante do mosquito, o vírus é recepcionado pelas células dendríticas que, em seguida, migra para linfonodos onde o VDENV faz a sua primeira replicação em linfonodos locais. O VDENV conduz à ativação dessas células, e à expressão de moléculas classe II do sistema HLA, bem como a produção de citocinas como Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon alfa (IFN- α) (Libraty *et al.*, 2001).

Através dos interferon (IFN), de citocinas como interleucina 2 (IL-2) e de uma variedade de glicoproteínas virais ocorre ativação das células *natural killer* (NK). Em seguida, ocorre a liberação de seus grânulos intracitoplasmáticos para o meio extracelular, ativando apoptose nas células infectadas. Outro mecanismo utilizado pelas células NK para inibir a infecção viral é a lise de células que não expressam MHC de classe I, uma vez que a expressão dessa molécula pode ser inibida pelo vírus infectante. Já o TNF estimula o recrutamento e ativação de leucócitos (monócitos e outros), bem como das células de adesão, com produção de IL-8 e outras citocinas (Gagnon *et al.*, 2002; Schroferneker, 2005).

Com o deslocamento das células dendríticas para os vasos e gânglios linfáticos, ocorre o contato com as células T; os linfócitos T CD4 são os primeiros que se ativam, com produção de IFN- γ , IL-2, TNF- α e β . A resposta de células T CD4⁺ ao VDENV tem atividade principalmente não citolítica, embora possa ser citolítica mediante perforinas ou mediada pela molécula Fas, capaz de induzir apoptose (Gagnon *et al.*, 2002; Quaresma *et al.*, 2006; Pagliari *et al.*, 2013).

A multiplicação nos linfonodos locais produz viremia capaz de disseminar o vírus por todo o organismo, livre no plasma ou no interior de monócitos/macrófagos. Os VDENV têm tropismo por estas células fagocitárias, as quais são reconhecidas como importantes sítios para sua replicação (Fonseca & Figueiredo, 2005; Gomes *et al.*, 2008).

A ativação dos linfócitos CD8⁺ ocorre posteriormente. Este tipo celular tem a capacidade de reconhecer antígenos virais via MHC classe I nas células infectadas com VDENV, eliminando-as por indução de apoptose ou pela liberação de proteínas

citolíticas como a perforina, além de produzir citocinas como IL-2 e IFN- γ (Rothman, 2003; 2004).

Para a prevenção e a cura das infecções pelos VDEN, tem fundamental importância a resposta humoral. De fato, os anticorpos ligam-se aos epítomos da proteína E do envelope viral e promovem lise viral por ativação da cascata do sistema complemento ou por bloqueio dos receptores celulares com consequente neutralização viral. Além disso, os anticorpos atuam como mediadores de fenômenos de citotoxicidade por linfócitos CD8+, através de seus receptores para a porção Fc de imunoglobulinas e, alternativamente, podem ser adjuvantes no mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, ao se ligar às células infectadas, permitindo a ação das células NK (Rothman, 2003; Machado *et al.*, 2004; Fonseca & Figueiredo, 2005).

A expressão das citocinas no microambiente tecidual representa um dos fatores mais importantes na indução de uma resposta imune. São conhecidos diversos padrões de resposta imune adaptativa como Th1, Th2, Th3, Th0, Th17 e outras. A decisão do sistema imune por seguir algum desses caminhos depende da ativação de quais subpopulações linfocitárias de células T CD4 foi ativada, sendo caracterizada pela produção de perfis de citocinas diferentes: IFN- γ e IL-2 pela Th1, IL-4, IL-5, IL-10 pela Th2, TGF- β pela Th3, IL17 e IL22 pela Th17, a Th0 produz ambos os padrões Th1 e Th2, desta forma, esses padrões implicam na polarização para uma resposta de preferência celular ou humoral (Karp *et al.*, 1996; Torres, 2005).

A maioria das infecções virais induz a produção de IFN pelas células NK, esse fato leva a uma preferência para ativação do padrão Th1, esse padrão está vinculado diretamente à morte de patógenos intracelulares, em parte pela síntese de óxido nítrico, bem como à indução de moléculas de MHC-I e MHC-II numa variedade de tipos celulares, e à maturação de células B para a secreção de imunoglobulinas (Karp *et al.*, 1996; Torres, 2005; Lorenzi, *et al.*, 2011).

Possivelmente a resposta imune do hospedeiro pode atuar de duas maneiras diferentes em resposta à infecção pelos VDEN. A primeira previne a infecção e propicia a recuperação nas infecções, a segunda acredita-se estar relacionada à imunopatologia da FHD/SCD (Silva & Angerami, 2007).

A infecção primária (primoinfecção) por dengue estimula anticorpos IgM que são detectáveis, em média, a partir do quarto dia após o início dos sintomas,

atingindo os níveis mais elevados por volta do sétimo ou oitavo dia e declinando lentamente, sendo, geralmente, não detectáveis após três a quatro meses. Os anticorpos da classe IgG são inicialmente observados em níveis baixos, a partir do sexto dia após o início dos sintomas, elevam-se gradualmente atingindo altos valores em duas semanas e mantêm-se detectáveis por vários anos, conferindo imunidade contra o sorotipo infectante, provavelmente, por toda vida (WHO, 2004; Silva & Angerami, 2007).

A recuperação de uma infecção primária deixa uma imunidade sólida com caráter permanente para um mesmo sorotipo (proteção homóloga). Após a primoinfecção, alguns anticorpos heterólogos (não-soro-específicos) permanecem circulando em quantidades subneutralizantes e há permanência de linfócitos de memória que sintetizam os anticorpos tipo IgG em quantidade muito maior do que na primeira infecção (Rothman, 2003; Gomes *et al.* 2008; Rothman, 2011).

Quando ocorre infecção secundária por dengue, os dois tipos de anticorpos estão presentes, facilitando, a este novo tipo infectante, a penetração maciça em macrófagos, utilizando para isto os receptores Fc γ de membrana (Martinez, 1998, Fiebre del dengue y dengue hemorrágico em infantes com infección primaria; Martinez, 1998, Dengue e dengue hemorrágica).

Esse evento denominado fenômeno de facilitação por anticorpos da penetração do vírus em monócitos (amplificação dependente dos anticorpos – ADA), seria explicado pela ligação dos anticorpos dirigidos contra o sorotipo responsável pela primeira infecção ao sorotipo infectante atual, porém sem a capacidade de neutralizá-lo. Este vírus teria agora a oportunidade de penetrar nas células através do seu receptor natural e pelos receptores Fc γ das imunoglobulinas (figura 5), o que determina a exarcebação da resposta inflamatória, pela liberação de múltiplas citocinas pelas células infectadas, sendo esta situação responsável clinicamente pela ocorrência da FHD/SCD (Halstead, 1980; Rothman, 2003; 2004; Gomes *et al.*, 2008). Esta é a explicação vigente para a maior frequência das formas hemorrágicas e de choque em pacientes infectados sequencialmente.

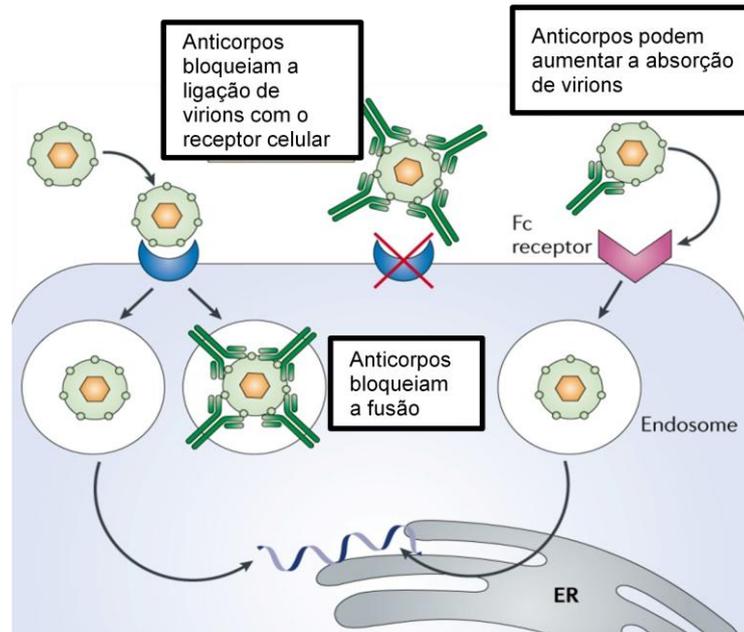


Figura 5- Mecanismo de neutralização do VDEN por anticorpos e facilitação da penetração do vírus por anticorpos em monócitos.

Fonte: Rothman, 2011.

Tem-se observado em pacientes com infecção por Dengue, relação entre a ADA e a resposta Th1, com mudança do tipo de resposta imune de Th1 para Th2. A supressão da resposta Th1 estaria relacionada à imunoamplificação a partir da infecção heterotípica e à supressão da produção de IFN- γ (Lei *et al.*, 2001). Foi sugerido que a ausência de IL-12 (Pacsá *et al.*, 2000), bem como o incremento dos níveis de IL-13 e IL-18 (Mustafa *et al.*, 2001), poderiam ser responsáveis pela alteração no padrão de resposta, desregulando a resposta imunitária com caráter transitório, contribuindo para a FHD.

1.5. FISIOPATOLOGIA

Na FD, os mecanismos fisiopatológicos da febre e mal-estar relacionam-se à presença, em níveis elevados, de citocinas séricas, como TNF- α , IL-6, IFN- γ etc. As mialgias relacionam-se, em parte à multiplicação viral no próprio tecido muscular, inclusive o oculomotor é acometido, produzindo cefaléia retrorbitária (Malheiros *et al.*, 1993, Fonseca & Figueiredo, 2005).

Os mecanismos fisiopatológicos das alterações clínicas na FHD/SCD são variados e não totalmente esclarecidos, cujos componentes coincidem no tempo e

se expressam como um todo em cada paciente, porém com particularidades quanto à sua intensidade e localização (Torres, 2005).

Ação direta do VDEN sobre a célula induz apoptose; esse mecanismo foi observado em várias células como monócitos humanos cultivados (Espina, Valero & Mosquyera, 2000), em hepatócitos (Marianneau *et al.*, 1996,1997), células Vero (Shafee & Bakar, 1997), células nervosas de neuroblastoma murino (Després *et al.*, 1996) e neurônios de camundongos lactentes, por inoculação intracerebral (Després *et al.*, 1998). Este fenômeno ajuda a explicar o comprometimento visceral e dos tecidos, pois por si só, o grau da resposta inflamatória observada em alguns órgãos (fígados e outros) não explicaria esse dano (Torres, 2005).

Pesquisadores conseguiram demonstrar a ação de anticorpos específicos, diretamente, contra proteínas não-estruturais. Alguns anticorpos obtidos de animais de laboratório, contra a proteína NS-1 do VDEN 2, reagem de forma cruzada contra fibrinogênio humano, plaquetas e células endoteliais, e a partir deste resultado, obtiveram um anticorpo monoclonal que reagia contra as proteínas NS-1 dos quatro sorotipos do VDEN, o qual produzia hemorragia em camundongos de laboratório e reagia de forma cruzada com o fibrinogênio humano, plaquetas e células endoteliais, com epítomos conhecidos ou sítios ativos de fatores humanos de coagulação, e com as proteínas integrinas/adesinas presentes em células endoteliais (Falconar, 1997).

As alterações fisiopatológicas pela ação de anticorpos específicos para dengue, também podem ocorrer por meio de ativação do sistema complemento. É provável que na Dengue, como na febre amarela (Schlesinger *et al.*, 1986), os anticorpos contra NS1 fazem com que as células infectadas fiquem sensibilizadas para a ação citolítica (Martinez, 2005), mediada por alguns componentes do complemento, como C3a e C5a, que são potentes anafilatoxinas, que podem induzir ou contribuir para o choque (Eldeman, 1973).

A ação dos linfócitos T citotóxicos (CD8+) na fisiopatologia está relacionado com a lise das células-alvo, induzindo apoptose (Mountz *et al.*, 1995); foi observado fragmentação do DNA, expressando a destruição celular mediada por linfócitos T citotóxicos (Schmid, 1986). As funções desses linfócitos são moduladas pelas IL-2, IL-7, IL-8, IFN- γ e IL-1 e seu inibidor (ambos produzidos por monócitos infectados), que podem causar imunossupressão e participar do processo da infecção por VDEN (Chang & Shaio, 1994).

Através de estudo da expressão de CD69 em linfócitos periféricos de crianças com dengue, foi evidenciado que a ativação precoce da imunidade celular no dengue está relacionada com a gravidade da doença, pois foi observada expressão precoce de CD69 em linfócitos de crianças com FHD, e em menor medida em crianças com FD (Greenn, Pichyangkul *et al.*, 1999).

As citocinas e os mediadores químicos, também são importantes na fisiopatologia da FHD, induzindo o aumento da permeabilidade vascular devido o mau funcionamento do endotélio vascular, podendo determinar efusão de plasma e choque (Basu & Chaturvedi, 2008). Estas citocinas incluem o TNF- α . Estudos demonstraram que pacientes com FHD alcançaram níveis de TNF- α mais elevados em relação aos que apresentaram FD e aos controles, e a sua elevação estava relacionada com a gravidade das FHD (Greenn, Vaughn *et al.*, 1999; Kittigul, 2000; Braga *et al.*, 2001).

Os macrófagos infectados liberam TNF- α e IL-1, citocinas que induzem a retração mais lenta e prolongada das células endoteliais, resultante de alterações do citoesqueleto, além de estimular nessas células, o aumento de expressão de integrinas (ICAM-1 e VCAM-1), podendo levar à lesão endotelial, como consequência do acúmulo de leucócitos ao longo da parede do vaso (Anderson R *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2008).

Nos casos de choque por dengue, a elevação de IL-8 e elastase foram significativamente superiores do que nos pacientes que não apresentam choque (Braga *et al.*, 2001), a elevação da IL-8 também foi mais observada na FHD quando comparada com a FD (Huang, *et al.*, 2001). O aumento de IL-8 e IL-1 induzido pelo TNF estimula a liberação de histamina armazenada nos mastócitos e basófilos; a histamina é o principal mediador da fase imediata de aumento da permeabilidade vascular, induzindo a contração do endotélio venular e formação das lacunas interendoteliais (Kumar *et al.*, 2008).

As hemorragias no dengue são um fenômeno multicausal: vasculopatia, trombocitopenia, distúrbios da coagulação e outros (Halstead, 1982). Sabe-se que ocorre uma invasão da medula óssea pelo vírus, levando ao acometimento de diversas linhagens celulares, incluindo a megacariocítica, originando plaquetopenia (Souza, 2008). A trombocitopenia não parece ser determinada apenas por uma diminuição na produção das plaquetas, mas sim por aumento da destruição

periférica, sendo demonstrado por um encurtamento da vida média das plaquetas (Mitrakul, 1977).

É sabido que a hemostasia depende do equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise. Nos doentes com Dengue observou-se déficit de fatores hepáticos II e V, bem como do fator IX, dessa forma dificultando a formação do tampão hemostático definitivo. Os vírus podem provocar nas plaquetas sua agregação ou desgranulação, o que pode induzir à trombose intravascular com depleção das plaquetas e fatores da coagulação (Torres, 2005).

Em pacientes com FHD encontram-se anticorpos de reação cruzada contra o plasminôgeno (Chungue *et al.*, 1994), os quais poderiam ser causa de ou contribuir para as hemorragias nas infecções por Dengue; ao mesmo tempo ocorre alterações como elevação do ativador do plasminogênio tissular (tPA) e no tempo parcial de tromboplastina ativada, o que aumenta a fibrinólise. Essas alterações têm sido muito mais intensas em pacientes com FHD/SCD do que naqueles com FD (Huang *et al.*, 2001).

1.6. PATOLOGIA

A patologia humana das arboviroses é diversificada, porquanto o mesmo agente pode induzir lesões com graus diferentes de intensidade ou mesmo pequenas variações nos órgãos ou tecidos comprometidos, justificando assim algumas variantes clínicas observadas.

Na Dengue, as biópsias da pele de pacientes mostram edema do endotélio dos pequenos vasos sanguíneos, edema perivascular e infiltrado de células mononucleares. Não obstante, têm-se demonstrado lesões da musculatura esquelética, do tecido conjuntivo periarticular, periósteo e do derma de animais infectados experimentalmente (Vasconcelos *et al.*, 2005).

As principais alterações patológicas observadas na Dengue referem-se a casos de FHD/SCD. Em necropsias de pacientes falecidos com esta doença observam-se hemorragias cutâneas, em trato gastrointestinal, no septo interventricular cardíaco, no pericárdio, em espaços subaracnóides e superfícies viscerais. A hepatomegalia e os derrames cavitários são achados frequentes. Os derrames em cavidade abdominal e espaço pleural possuem alto teor protéico, com

predomínio de albumina e contêm material hemorrágico (Vasconcelos *et al.*, 2005; Fonseca & Figueiredo, 2005).

Em pacientes adultos com hemorragias, existem evidências de coagulação intravascular, abundantes megacariócitos em capilares pulmonares, glomérulos renais, sinusóides hepáticos e esplênicos. Em linfonodos e baço, há proliferação linfoplasmocitária com grande atividade celular e necrose de centros germinativos. Na medula óssea ocorre bloqueio da maturação megacariocítica e de outras linhagens celulares. Observa-se no fígado hiperplasia, necrose hialina de células mononucleares com citoplasma acidófilo e vacuolizado, os hepatócitos apresentam graus variáveis de esteatose e necrose mediozonal. Os rins apresentam achados anatomopatológicos compatíveis com glomerulonefrite, relacionada, provavelmente, à deposição de imunocomplexos em membrana basal glomerular (Fonseca & Figueiredo, 2005).

Foi realizado um estudo com dados obtidos de autópsias de 72 crianças falecidas durante a epidemia de FHD/SCD, causado pelo VDEN sorotipo 2 em Cuba, em 1981, onde embora não houvesse um padrão único de alterações anatomopatológicas, as lesões foram de congestão, hemorragia, edema, necrose e, em menor medida, inflamação. Os órgãos mais afetados foram o fígado, o pulmão, o coração, os intestinos e, em menor frequência, o encéfalo (Bravo *et al.*, 1987; Torres, 2005).

Os achados de necropsias nessas crianças apresentaram em mais de 60% dos casos hemorragia gastrintestinais, ascite, necrose hepática, hidrotórax, edema pulmonar e hemorragia pulmonar, entre 30% e 60% dos casos apresentaram edema cerebral, hemorragia intra-hepática, congestão esplênica, congestão hepática e congestão renal, e em menos de 30% dos casos foi observado atelectasia, hidropericárdio, inflamação hepática, infiltrado inflamatório pulmonar, dilatação cardíaca, hemorragia traqueobrônquica, ulcerações gástricas agudas, hemorragia pericárdica e hemorragia renal (Bravo *et al.*, 1987; Torres, 2005).

Outro estudo anatomopatológico foi realizado durante a epidemia de dengue e FHD em Santiago de Cuba, em 1997, todos os óbitos (12 pacientes) ocorreram em adultos. Diferentemente da maioria das crianças durante a epidemia ocorrida em Cuba em 1981, quase todos os adultos necropsiados tiveram algum grau de miocardite, o quadro histológico lembrava o das miocardites chamadas imunológicas associadas à hipersensibilidade (Torres, 2005).

A congestão visceral foi observada com frequência nas duas epidemias, bem como hemorragia da mucosa gastrintestinal, necrose e esteatose hepática e, em alguns casos necrose tubular aguda. O edema encefálico nos pacientes adultos também foi mais frequente do que o encontrado em crianças, sendo que na segunda epidemia um paciente apresentou encefalopatia hemorrágica difusa e o outro faleceu em coma por lesão hemorrágica do talo cerebral (Bravo *et al.*, 1987; Torres, 2005).

As lesões hemorrágicas foram constatadas nas duas epidemias, no trato digestivo, pulmão, supra-renais (petéquias na primeira epidemia e hemorragia cortical focal na segunda) e outras localizações (Bravo *et al.*, 1987; Torres, 2005).

Em um estudo de um caso fatal de infecção por VDEN-3 no Rio de Janeiro, na epidemia de 2002, os resultados histopatológicos revelaram danos severos nos tecidos, causados por hemorragia intensa, edema intersticial e inflamação. O fígado apresentava intensa congestão com múltiplos focos hemorrágicos. Na microscopia óptica, foi observado infiltrado de células mononucleares ao redor do espaço porta, com vacuolização no citoplasma de hepatócitos e aumento de células inflamatórias dentro dos sinusóides. Esses dados corroboram a concepção de que o fígado é um importante sítio de replicação para o VDEN (Basílio-De-Oliveira *et al.*, 2005).

No pulmão e no baço desses pacientes, foi observado vacuolização focal e edema intersticial em torno de uma infiltração de macrófagos e linfócitos, já no parênquima de outros órgãos observou-se hemorragia. Foi realizada detecção de antígeno do VDEN-3, através da técnica de imunohistoquímica, sendo identificados antígenos do vírus em células inflamatórias do fígado, pulmão, coração, rim e linfonodo, assim como hepatócitos e células endoteliais (Basílio-De-Oliveira *et al.*, 2005).

1.7. FÍGADO

1.7.1. Histofisiologia do fígado

O Fígado é a maior glândula do corpo, com funções endócrinas e exócrinas, é formado por quatro lobos poucos definidos, sendo revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo. O lóbulo hepático é a unidade estrutural e funcional do fígado, um hexágono constituído de cordões de hepatócitos anastomosados delimitando os

capilares sinusoides. Esses sinusóides hepáticos são revestidos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas e pelas células de Kupffer (macrófagos residentes) (figura 6), sendo circundado e sustentado por uma delicada bainha de fibras reticulares (Junqueira & Carneiro, 1992).

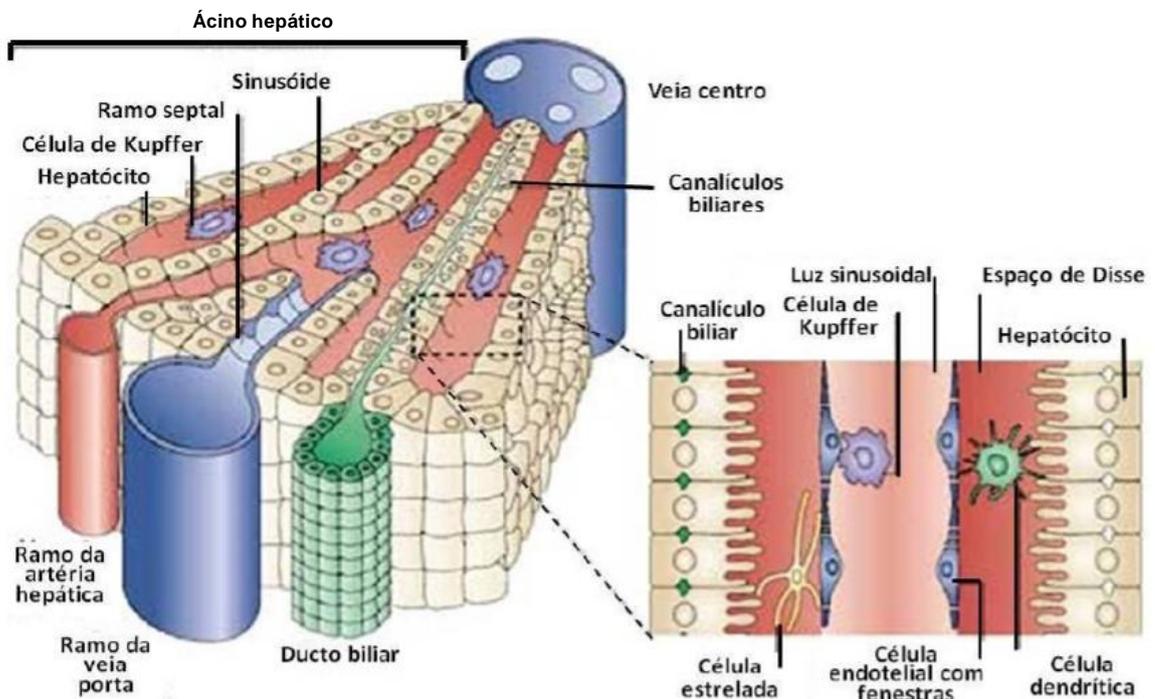


Figura 6 - Organização do ácino hepático.
Fonte: Adams e Eksteen.

Assim como os cordões de hepatócitos convergem para o centro do lóbulo, os sinusóides correm radialmente para o centro formando a veia hepática central (vênula hepática terminal, veia central ou veia centrolobulillar, VHC) (figuras 6 e 7), enquanto nos vértices do hexágono encontram-se os espaços porta (EP) (figura 7), composta pela tríade portal, um ramo da veia porta (vênula porta), um da artéria hepática (arteríola) e um ducto biliar (figura 6), somados a vasos linfáticos e nervos, envoltos por uma bainha de tecido conjuntivo (Kierszenbaum & Tres, 2012; Junqueira and Carneiro, 1992).

A veia porta transporta sangue dos intestinos, baço e pâncreas e fornece para o fígado 75 a 80% do suprimento sanguíneo, o restante é suprido pelo ramo da artéria hepática com sangue oxigenado. As vênulas porta e arteríolas hepáticas ramificam-se e desembocam diretamente nos sinusoides, provendo uma mistura de sangue venoso portal e arterial que fornece aos hepatócitos quantidade adequada

de nutrientes. A absorção das substâncias advindas do sangue e a secreção de proteínas plasmáticas ocorrem em um espaço perissinusoidal, o espaço de Disse (figura 6), localizado entre os microvilos do domínio basolateral do hepatócito e a parede do sinusóide. Nesse espaço são encontradas fibras colágenas dos tipos I, III e IV, além de células perissinusoidal de Ito que são fibroblastos modificados armazenadores de lipídios e ricos em vitamina A (Kierszenbaum & Tres, 2012; Junqueira & Carneiro, 1992).

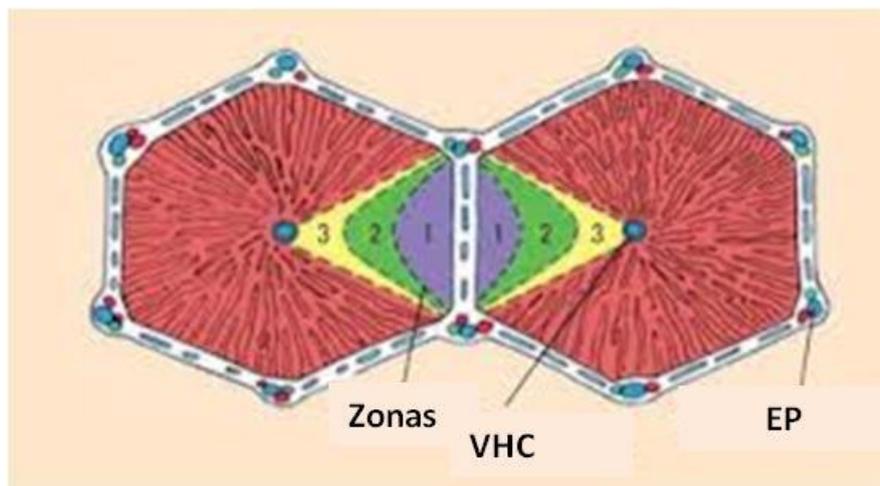


Figura 7: Arquitetura do parênquima hepático. Representados por um lóbulo hexagonal com o ácino dividido por zonas.
Fonte: adaptado de Kuma, 2005.

O domínio apical do hepatócito está em contato com a superfície de outros hepatócitos, delimitando um espaço tubular entre si conhecido como canalículo biliar. A superfície desse canal apresenta poucos microvilos em seu interior e as membranas celulares próximas desse canalículo são seladas lateralmente por junções de oclusão, evitando o vazamento da bile que foi liberada pelos hepatócitos no canalículo e flui progressivamente na direção oposta ao sangue. Na periferia do lóbulo a bile é transportada pelo canal de Hering até os ductos biliares localizados no espaço porta (Kierszenbaum & Tres, 2012; Jugermann & Katz, 1989).

A visão funcional da arquitetura do lóbulo hepático é importante para se explicar alterações funcionais e histológicas do fígado. O Conceito clássico do lóbulo hepático baseado em parâmetros estruturais, onde os hepatócitos são organizados em torno da vênula hepática descrito por Kiernan (1833), vêm sendo substituído pelo conceito do ácino hepático, o qual se baseia na organização dos hepatócitos ao longo da via microcirculatória que com seu gradiente de pressão conduz oxigênio e

nutrientes das arteríolas e vênulas porta para as vênulas hepáticas terminais, desta forma, do ponto de vista da fisiologia circulatória as vênulas hepáticas são consideradas a periferia da microcirculação hepática e não o centro (Rappaport, 1976).

No ácino hepático a corrente sanguínea determina um decrescente gradiente metabólico dividindo o ácino em zonas 1, 2 e 3 (figura 7). A zona 1 (Z1) é a mais próxima à tríade portal, sendo perfundida por sangue rico em oxigênio, substratos e hormônios. A zona 3 (Z3), é próxima a veia central, recebendo sangue que já passou por troca de gases e metabólitos, por isso empobrecido de oxigênio e nutrientes, mas rico em CO₂ e outros produtos do metabolismo. A zona 2 (Z2), é uma extensão do tecido entre Z1 e Z3, zona intermediária em relação à quantidade de oxigênio (Jugermann & Katz, 1989).

Outro importante fator na funcionalidade do fígado é a heterogeneidade entre os hepatócitos de cada zona acinar. As zonas diferem no conteúdo de enzimas e estruturas subcelulares das células do parênquima e contem diferentes números de células não parenquimatosas. A partir dessas observações foi proposto o conceito conhecido como “zonalidade metabólica” que se baseia no metabolismo de carboidratos e de outras vias metabólicas, como o metabolismo enzimático. Servindo de exemplo, temos o processo gliconeogênese que ocorre em Z1, assim como a glicólise e lipogênese em Z3. A síntese da ureia é principalmente catalisada em Z1, enquanto a síntese de glutamina em Z3 (Kierszenbaum & Tres, 2012; Jugermann & Katz, 1989).

A expressão de genes nas diversas zonas tem sido estudada, altos níveis de RNAm de fosfoenolpiruvato carboxicinas e de citocromo P-450 foram observados em Z1 e Z3 respectivamente. Esta expressão gênica zonada estabelece localidade de eventos como à desintoxicação de hepatócitos em Z3, atividade que exige citocromo P-450. Acredita-se que a expressão gênica nos hepatócitos seja determinada pela concentração de sinais regulatórios fornecidos pelo sangue ao fluir por cada zona do ácino (Alves *et al.*, 2001).

Em Z1 é observado uma quantidade maior de mitocôndrias que em Z3, além de diferenças morfológicas entre essas mitocôndrias. Na Z3 é observada maior quantidade das enzimas glicocinase e piruvato cinase. Estas diferenças demonstram que os hepatócitos da Z1 são mais equipados para determinados processos, enquanto os hepatócitos da Z3 se mostram mais equipados para outros. O

catabolismo de ácidos graxos e aminoácidos são possíveis somente na presença de oxigênio, por isso a predominância desses processos na zona mais oxigenada, já o processo de glicólise é possível na ausência de oxigênio, podendo ser situado na zona menos oxigenada (Jugermann & Katz, 1989).

1.7.2 Funções imunológicas do fígado e características das hepatites virais.

O fígado é considerado um órgão imunorregulatório, mas, não é classificado como um órgão de função primariamente imunológica. Ele possui componentes da resposta imune inata e adaptativa, embora, apresente um predomínio da imunidade inata, contendo componentes, tais como, as células de Küpffer, células de pit, que são células com funções de NK, além de IFNs, complemento (fração) entre outros (Gao *et al.*, 2008); por ser um órgão altamente vascularizado, durante infecções e inflamações sistêmicas, é sempre “visitado” por um grande número de polimorfonucleares, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos T e B, e células NK circulantes (Martins, 2001).

As células de Ito também têm participação, embora indireta, na imunologia do fígado, através da gênese das lesões imunológicas. O TGF- β liberado por células de Küpffer e por hepatócitos estimula a produção de colágeno do tipo I pelas células perissinusoidais de Ito, um processo conhecido como fibrogênese que compromete com o fluxo de sangue venoso dos espaços porta (Kierszenbaum and Tres, 2012).

O fígado é o principal sítio capaz de remover macromoléculas e microorganismo circulantes provenientes da circulação sistêmica, essa remoção é realizada pelo sistema reticuloendotelial hepático, o qual é composto por células endoteliais fenestradas, responsáveis por remover macromoléculas solúveis e resíduos coloidais, bem como, pelas células de Küpffer que eliminam resíduos insolúveis por fagocitose (Gao *et al.*, 2008).

Praticamente qualquer agressão ao fígado é capaz de destruir hepatócitos e recrutar células inflamatórias. A maioria das doenças hepáticas decorre de inflamações parenquimatosas de fundo imunológico , ativando diversos compartimentos imunes do fígado que afetam os hepatócitos, acarretando desde distúrbios funcionais de intensidade variada até a necrose (Kumar *et al.*, 2008).

Presença de infiltrado inflamatório mononuclear é característico de doenças virais no fígado, bem como, injúria hepática mediada por linfócitos T; os linfócitos

têm dificuldade para se movimentar na densa estrutura celular do fígado, portanto, muitas de suas ações são mediadas por citocinas, podendo ter efeitos nocivos nas células hepáticas que possam estar no local de sua liberação (Martins, 2001).

Qualquer vírus hepatotrópico pode causar hepatite viral aguda. Os principais componentes da fase aguda da hepatite são o infiltrado celular inflamatório e o dano hepatocelular; outras características incluem colestase, ativação de células de Küpffer, endotelite, dano no ducto biliar e regeneração hepatocelular (Santos, 2008).

São observados danos celulares desde pequeno edema, tumefação degenerativa (edema mais severo) até morte celular (necrose e apoptose). Outra forma de dano hepatocelular na fase aguda é a necrose focal, no qual placas de hepatócitos são interrompidas ou substituídas por pequenos grupos de linfócitos e macrófagos; esses focos irregulares marcam um sítio de morte celular que é deduzida pela ausência dessas células (Lefkowitz, 2010). Nos casos de hepatite aguda grave, a necrose confluyente pode levar à necrose em ponte que é caracterizada por estabelecer conexões do tipo portal-portal, central-portal e portal-central entre lóbulos adjacentes (Kumar *et al.*, 2008).

Na hepatite viral aguda o infiltrado linfocítico é observado dentro do parênquima e trato portal, sendo normalmente mais evidente na Z3. Embora as alterações do parênquima sejam predominantes na hepatite aguda, também é sempre observada inflamação portal, afetando muitos ou todos os espaços porta; a veia hepática terminal pode apresentar interrupções do endotélio e infiltrado linfocítico, enquanto sinusóides e células endoteliais também participam da hepatite, através das células endoteliais sinusoidais que podem aumentar de tamanho (Lefkowitz, 2010).

Hepatite crônica é definida pela presença de evidências sintomatológica, bioquímica ou sorológica de doença hepática contínua ou recorrente durante um período de mais de seis meses, acompanhada de inflamação e necrose histologicamente documentada (Kumar *et al.*, 2008). A maior parte dos espaços porta estão infiltrados extensamente por linfócitos, bem como, pequenos números de células plasmáticas e ocasionais leucócitos (Lefkowitz, 2010).

Na hepatite crônica de intensidade branda, o infiltrado é confinado no espaço porta e a margem do trato portal permanece normal, nas formas mais severas, a infiltração se estende para o parênquima adjacente. Quando o infiltrado inflamatório se estende do espaço porta para o parênquima adjacente com destruição de

hepatócitos é denominado hepatite de interface; este processo é identificado pela irregularidade das placas limitantes de hepatócitos em torno do espaço porta, podendo variar na severidade e extensão. Na hepatite de interface severa, as células progenitoras periportais (Z1) podem ser ativadas para produzir uma reação ductolar (proliferação das células epiteliais dos ductos biliares) (Lefkowitz, 2010).

A necrose periportal contínua e necrose em ponte são prenunciadoras de dano hepático progressivo durante a hepatite crônica. A característica distintiva do dano hepático grave é a deposição de tecido fibroso, que têm início nos espaços porta e com o passar do tempo pode ocorrer fibrose periportal, seguida pela união dos septos fibrosos entre os lóbulos (fibrose em ponte). A perda contínua de hepatócitos e a fibrose resultam em cirrose, com a presença de septos fibrosos e nódulos regenerativos de hepatócitos (Kumar *et al.*, 2008).

1.8 MODELO ANIMAL PARA INFECÇÃO PELO VDEN

Não há publicações da ocorrência de epizootias pelo VDEN em natureza, evidenciando a dificuldade de encontrar um modelo animal que represente o quadro de infecção e manifestação da doença compatível aos observados em humanos. O desenvolvimento de um modelo animal apropriado tem sido dificultado pelo baixo nível ou falta de replicação desses vírus (principalmente cepas do tipo selvagem) em camundongos e a ausência da manifestação da doença em primatas não-humanos (PNH) (Zompi & Harris, 2012).

Apesar das limitações já citadas o entendimento da patogênese da Dengue tem sido beneficiado através da utilização de camundongos geneticamente modificados. Estudos (Ashour *et al.*, 2010; Perry *et al.*, 2011) identificaram que em camundongos a transcrição do IFN tipo I através da via de sinalização STAT2, restringe o início da replicação do VDEN. A proteína NS5 é capaz de se ligar e degradar STAT2 em humanos, mas não em camundongos, refletindo nestes uma resistência natural ao VDEN. Esse conhecimento tornou possível, através da tecnologia de camundongo transgênico, o desenvolvimento de um modelo de camundongo imunocompetente capaz de alcançar níveis mais altos de replicação viral.

Camundongos NOD/SCID que são geneticamente modificados para apresentar deficiência no sistema imunológico, como carência de células T e B, além

de problemas no desenvolvimento e nas funções das células NK e apresentadoras de antígenos, foram infectados experimentalmente com VDEN-2 e apresentaram sinais clínicos semelhantes a de FD em humanos (febre, exantema e trombocitopenia), sugerindo que esses animais podem ser utilizados para estudar a patogenia da Dengue (Bente *et al*, 2005).

Tan *et al.* (2010) utilizando camundongos transgênicos, em estudo experimental, descreveu que a cepa não adaptada do VDEN-2 (D2Y98P) foi altamente virulenta em camundongos AG 129 (camundongos deficientes em IFN alfa, beta e receptores gama). A infecção induziu expressão de muitas citocinas, danos em órgãos e hemorragia, levando a morte rápida dos animais no pico da viremia. No mesmo experimento, com a inoculação de uma dose viral mais baixa, foi observado replicação assintomática do vírus, além de disseminação e danos para órgãos relevantes; também foi relatado aumento da permeabilidade vascular, sem sinal de hemorragia, sugerindo manutenção da integridade vascular.

O VDEN tem a capacidade de infectar células relevantes em PNH, sendo um modelo útil para investigar a resposta imune à infecção por Dengue, eles desenvolvem uma resposta de anticorpos semelhante à observada em seres humanos (Marchete *et al*, 1973). Estudo com primatas do Novo Mundo, da espécie *Aotus nancymae*, demonstrou que infecções sequenciais nesses animais induziram uma resposta imunológica de reatividade cruzada, com os maiores títulos de anticorpos contra o sorotipo da primeira infecção (Kochel *et al*, 2005), remanescente do que foi demonstrado em seres humanos (Kyle *et al*, 2008). Também foi observado, viremia aumentada após infecção secundária em PNHs infectados experimentalmente com VDEN, sugerindo que infecção sequencial pode aumentar a carga viral através da reação cruzada dos anticorpos heterotípicos não neutralizantes (Marchete *et al*, 1973).

A inoculação experimental com uma dose infectante de 10^5 PFU do VDEN em PNH (*Macaca mulatta*) pode sustentar a replicação viral, no entanto, a replicação foi muito menor do que nos seres humanos, ficando limitada aos tecidos linfóides (Marchete *et al*, 1973); também foi observado nesses animais diminuição do número de plaquetas, mas sem outros sinais clínicos evidentes (Halstead *et al*, 1973 Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I.; Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. II.).

Recentemente , a inoculação com uma dose mais elevada do VDEN, via intravenosa nesses animais, provocou hemorragia e coagulopatia, apresentando manifestações hemorrágicas semelhantes às observadas em humanos, podendo potencialmente ser usado para testes pré-clínicos de intervenções terapêuticas, visando especificamente coagulopatia associada a VDEN (Onlamoon *et al.*, 2010).

Embora vários estudos relatarem que animais infectados com VDEN desenvolvem viremia transitória e não reproduz níveis de viremia como observados em humanos (Onlamoon *et al.*, 2010; Marchete *et al.*, 1973), um estudo com saguis (*Callithrix jacchus*), conseguiu reproduzir altos níveis de viremia, além de reproduzir proteção imunitária. Os resultados indicaram que a infecção pelo VDEN foi estabelecida após a inoculação primária em saguis, sendo observado viremia consistente em todos os animais infectados experimentalmente inoculados com várias cepas isoladas de amostras clínicas humanas, que foram usadas com várias doses na inoculação 10^7 - 10^3 (Omatsu *et al.*, 2011).

Nesses animais também foram avaliados os valores hematológicos e bioquímicos, além de temperatura corporal e nível de atividade. Os saguis inoculados com o VDEN demonstraram sinais clínicos, incluindo febre e diminuição da atividade e alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos (Omatsu *et al.*, 2012), evidenciando o potencial desse animal como modelo experimental para infecção por Dengue.

1.9 O GÊNERO *CALLITHRIX*

O gênero *Callithrix* pertence à família Callithrichidae e possui as espécies *Callithrix jacchus* (saguis-de-tufo-branco), *C. penicillata* (saguis-de-tufo-preto), *C. kuhlii* (saguis-de-Weid), *C. geoffroyi* (saguis-de-cara-branca), *C. aurita* (saguis-de-serra-escuro), e *C. flaviceps* (saguis-da-serra) (Rylands *et al.*, 2000). Dessas espécies o sagui-de-tufo-branco é a melhor conhecida e que tem gerado maior interesse biomédico (Mittermeier *et al.*, 1994).

Essas espécies se distribuem pela costa leste brasileira e porção central da Mata Atlântica (Rylands *et al.*, 1997), em diferentes habitats como floresta atlântica, florestas do cerrado do Brasil Central e caatinga do Nordeste brasileiro, vivem predominantemente em áreas de matas ciliares que bordeiam os córregos nessas

regiões, e essas espécies se adaptam às áreas de florestas perturbadas (Farias, 1986; Rylands, 1986).

Todas as espécies desse gênero apresentam tamanhos aproximados, o peso varia de 250 a 450g em adultos e os filhotes nascem com peso médio de 30g, vivem em grupos sociais que variam de três a quinze indivíduos, compostos por adultos (machos e fêmeas) e a prole. Vários autores consideram os saguis monogâmicos (Abbot *et al.*, 2003; Alencar *et al.*, 1995; Rylands, 1986), mas, há relatos de poliandria, poligenia e poliandroginia, em grupos de saguis mantidos no cativeiro e em vida livre (Coutinho & Correa, 1995; Digby & Barreto, 1993; Roda & Pontes, 1998), isso evidencia que o sistema de organização social dos *Callithrix* não está completamente estabelecido e a condição de cativeiro introduz possíveis alterações no seu comportamento social e reprodutivo (Yamamoto, 1991).

Os saguis-de-tufo-branco, alcançam maturidade sexual entre 12 e 18 meses e são considerados idosos a partir dos oito anos de idade (Abbot *et al.*, 2003), a longevidade dessa espécie pode chegar a 16 anos em cativeiro (Nowak, 1991). A temperatura retal desses animais pode atingir o grau máximo durante o dia de 39,8^o C e temperatura mínima no período da noite de 34^o C (Hetrerington, 1978).

A atividade diária dos saguis no cativeiro é dividida em movimentação (35%), catação dos pelos (10%), alimentação (12%) e posição estacionária (43%). As espécies *Callithrix jacchus* e *C. penicillata*, se alimentam em natureza de frutas, flores, insetos, aranhas, lesmas, lagartos, sapos, filhotes e ovos de pássaros e exsudato de plantas, que representam 70% da dieta desses animais (Stevenson & Rylands, 1988; Rowe, 1996).

1.10 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A Dengue constitui um dos principais problemas de saúde pública no mundo (Halstead, 1982), pois o número de casos está em contínua ascensão, assim como a mortalidade. Com seu caráter epidêmico, a Dengue ocasiona um significativo impacto econômico e social, os serviços de saúde pública não têm sido capazes de diminuir a incidência desta doença, e um dos fatores que colaboram com esta situação é a falta de vacina contra Dengue (Gómez-Dantés & Willoquet, 2009).

Apesar dos esforços para obtenção de uma vacina contra a Dengue, parte da dificuldade de obtenção, se deve à inexistência até hoje de um modelo experimental

que apresente quadro de FD e FHD/SCD, fidedignos aos observados em humanos, possibilitando dados sobre a patogenia e fisiopatologia da doença, favorecendo o desenvolvimento de testes pré-clínicos de uma vacina tetravalente para dengue (Whitehead *et al.*, 2007).

O cultivo primário de monocamadas de células endoteliais de humanos em interação com fragmentos do VDEN é, atualmente, o modelo experimental mais aceito e mais utilizado nos estudos de FHD/SCD (Peyrefitte *et al.*, 2006). Sabe-se, porém, que o método de isolamento das células e o meio de cultura utilizado podem alterar os resultados, como visto em alguns trabalhos com HIV *in vitro* (Dhawan *et al.*, 1997). Quanto aos modelos experimentais em camundongos e PNH, algumas limitações são observadas como, suscetibilidade à infecção e manifestação de sinais clínicos (Yauch & Shresta, 2008; Zompi & Harris, 2012).

Em Lauro Feitas, na Bahia, durante uma epizootia em 2008-2009, o Instituto Evandro Chagas (IEC) demonstrou a presença de antígenos virais para dengue, através do teste de Imuno-histoquímica, em primata da espécie *Callithrix jacchus* que morreu com quadro hemorrágico (De Barros *et al.*, 2009). Nas Américas, o vírus nunca havia sido detectado a partir de espécies silvestres, nem de primatas não-humanos no Brasil, além de ser considerado o primeiro PNH diagnosticado com FHD, tal descoberta abre perspectivas de se reconhecer um possível hospedeiro silvestre de dengue nesta região.

Com base nesses estudos citados acima, aliados ao fato que o fígado é o órgão onde se observa as principais alterações provocadas pelo VDEN (Vasconcelos *et al.*, 2013), torna importante verificar o fígado de primatas do gênero *Callithrix* para estudar a patogênese e a imunopatologia da infecção sequencial pelo VDEN.

1.11 OBJETIVOS

1.11.1 Objetivo Geral

Descrever a imunopatologia da infecção experimental sequencial do VDEN-3 e VDEN-2 em PNH do Novo Mundo da espécie *Callithrix penicillata*.

1.10.2 Objetivos Específicos

- Verificar a suscetibilidade do PNH espécie *Callithrix penicillata* a infecção experimental sequencial pelo VDEN;
- Descrever padrão de lesão hepática segundo distribuição no ácino dos calitricídeos infectados experimentalmente com VDEN -3 e VDEN-2;
- Quantificar a distribuição de antígenos virais nos fígados dos PNH em estudo;
- Identificar e quantificar o fenótipo das células do infiltrado inflamatório acinar, portal e veia centrolobular nos fígados coletados durante a cinética experimental;
- Caracterizar a expressão tecidual de citocinas no fígado dos calitricídeos estudados;
- Comparar os resultados obtidos na fase aguda com os observados na fase de convalescência da infecção primária e secundária, afim de estabelecer parâmetros no fígado de calitricídeos durante as fases da infecção pelo VDEN;
- Comparar os resultados obtidos na infecção primária com os observados na infecção secundária, afim de verificar possíveis diferenças imunopatológicas entre as infecções;
- Avaliar o PNH da espécie *Callithrix penicillata* como modelo experimental para a infecção pelo VDEN, envolvendo estudos imunopatológicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS E ESTOQUE VIRAL

Para este estudo foram selecionadas amostras virais do VDEN 2 e 3, provenientes do acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas (IEC) (Quadro 1). Essas cepas são procedentes do Rio Grande do Norte, de casos de óbitos em humanos por FHD/SCD, classificado segundo MS e foram identificadas geneticamente por Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (RT-PCR). Esses dois sorotipos tem sido comumente associados com infecção secundária em epidemias importantes com FHD/SCD (Torres, 2005).

Quadro 1- Amostras virais selecionadas para inoculação sequencial em PNH.

Registro SAARB	Procedência	Espécimes	Data da coleta	Identificação viral
RE H 744248	Natal/RN	Linfonodo	04/03/2008	VDEN-2
RE H 712149	Natal/RN	Fígado	11/08/2006	VDEN-3

Fonte: SAARB.

Para produção do estoque viral, suspensões virais do VDEN-2 e do VDEN-3 foram preparadas a partir de fragmentos de linfonodo e fígado, respectivamente e inoculados em linhagem de células clone C6/36, oriundo de artrópodes hematófagos da espécie *Aedes albopictus* (Igarashi, 1978).

Para o cultivo C6/36 (mantido à aproximadamente 28°C) foi utilizado garrafas de 75 cm² contendo o meio Leibowit'z L-15 com L-glutamina suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) (meio de crescimento), triptose fosfato (2,95%), antibióticos (penicilina 10.000 U/L e estreptomicina 10.000 µg/L) e aminoácidos não-essenciais (10 mL/L) (Barbosa *et al.*, 1993). Antes das células serem infectadas, o meio de crescimento foi substituído pelo meio de manutenção (2% de SBF).

Os inóculos foram produzidos a partir de fragmentos de linfonodo e fígado mascerados, sendo preparada uma suspensão na proporção de 1:10 em solução de salina tamponada (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, as

suspensões obtidas foram centrifugadas a 5.000 rotação por minuto (rpm) durante cinco minutos, à 4° C (Travassos da Rosa *et al.*, 1998). 150 µL do sobrenadante foram inoculados em garrafas que contenham uma monocamada confluyente de células. Cada inoculação teve um controle positivo (células infectadas com VDEN) e um controle negativo (células não-infectadas com VDEN). Após a infecção, todos os tubos foram observados diariamente durante 21 dias em microscópio ótico invertido para visualização de possível efeito citopático (Travassos da Rosa *et al.*, 1998).

Para a confirmação da presença do VDEN-2 e VDEN-3 nas células infectadas, uma parte do sobrenadante celular foi utilizada em testes de imunofluorescência indireta (IFI) utilizando anticorpos monoclonais, de acordo com a técnica descrita por Gubler *et al.* (1984).

2.2. PRIMATAS NÃO HUMANOS

Foram utilizados 28 PNH, da espécie *Callithrix penicillata* (figura 8), machos e fêmeas, entre jovens (sete animais), adultos (17 animais) e idosos (quatro animais) (Apêndice A). Esses animais são procedentes da colônia de *Callithrix penicillata* do Centro Nacional de Primatas/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (Cenp/SVS/MS), que desenvolve trabalhos de captura, reprodução e conservação de espécies de PNH para investigações biomédicas objetivando sempre a saúde pública. Os procedimentos envolvendo PNH (até a etapa de necropsia) foram realizados por médicos veterinários.



Figura 8 - PNH da espécie *Callithrix penicillata*.
Fonte: Marcos Labanca.

2.2.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo CEPAN/IEC (comitê de pesquisa com animais do IEC) sob Registro CEPAN Nº 0061/2009 e aprovado pelo IBAMA sob registro Nº 22047-1, podendo ser verificado a regularidade, por meio da página do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO na internet através do código de autenticação 92345318.

2.2.2. Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão no experimento dos *C. penicillata* foram baseados em:

- (I) Animais que não estavam sendo usados para procriação, sendo, portanto excedentes de colônia;
- (II) Animais submetidos a exames hematológicos e bioquímicos que apresentaram resultados dentro da normalidade para espécie;
- (III) Animais que submetidos à sorologia usando a técnica de Inibição da Hemaglutinação (IH) apresentaram resultados negativos para presença de anticorpos contra os seguintes arbovírus: VDEN-1, 2, 3, 4, vírus da encefalite equina leste (VEEE), vírus da encefalite equina oeste (VWEE), vírus mayaro (VMAY), vírus mucambo (VMUC), vírus guaroa (VGUA), vírus da febre amarela (VFA), vírus rocio (VROC), vírus ilhéus (VILH), vírus da encefalite saint loius (VSLE), vírus tacaiuma (VTAC), vírus maguari (VMAG), vírus caraparú (VCAR), vírus oropouche (VORO), vírus catú (VCAT), vírus icoaraci (VICO), vírus utinga (VUTI), vírus cacipacaré (VCPC), vírus bussuquara (VBSQ), vírus belém (VBLM);
- (IV) Tinham idade compreendida entre 1 e 10 anos.

Os critérios de exclusão se basearam nos animais que não se enquadram nos critérios de inclusão, ou algum outro indício de comprometimento da saúde observado pelos veterinários responsáveis.

2.2.3. Calitricídeos Selecionados

Os animais que foram selecionados pertencentes ao plantel de calitricídeos do CENP, encontravam-se alojados em sistema *indoor*, em grupo familiar, no galpão de reprodução IV, telado e com iluminação natural e artificial, composto de 120 recintos de alumínio com dimensões de 1,51 m de comprimento x 0,85 m de largura x 02,03m de altura; recebiam alimentação balanceada, conforme protocolo nutricional da instituição, com frutas, legumes, tubérculos, leite, ovos, ração peletizada específica para calitricídeos (Megazoo P25) e água *ad libitum* (Informações cedidas pela veterinária responsável, Manejo de Primatas do Cenp/SVS/MS).

Foram realizados rotineiramente nesses animais, inspeção física, biometria, pesagem, avaliação odontológica, exames laboratoriais, como hemograma, microbiológicos e dosagens bioquímicas, além de exames coproparasitológicos, seguido de vermifugação, utilizando bases farmacológicas, conforme incidência parasitária. Quando necessário, eram realizados exames complementares (radiológico e ultrassonográfico). Medidas de biossegurança e procedimentos operacionais padronizados de higienização dos galpões, das instalações e equipamentos seguem recomendações estabelecidas pelo CENP, baseadas na literatura da área, Molinaro *et al.* (2001) (Informações cedidas pela veterinária responsável, Manejo de Primatas do Cenp/SVS/MS).

Após a seleção dos calitricídeos de acordo com o item 3.2.2., esses animais foram transferidos para o galpão de quarentena II, permanecendo alojados em gaiolas individuais de fundo retrátil (0,80 m de comprimento x 0,80 m de largura x 0,90 de altura), sendo monitorados diariamente (observando qualquer alteração do quadro de normalidade desses animais) até seus respectivos sacrifícios, seguido de necropsia (Informações cedidas pela veterinária responsável, Manejo de Primatas do Cenp/SVS/MS).

2.3. CINÉTICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

2.3.1. Infecção Primária

Os animais foram inoculados experimentalmente com sobrenadante de células de *Aedes albopictus*, C6/36 infectadas pelo VDEN-3, sendo uma dose de 0,5

mL via subcutânea à altura do 3º espaço intercostal direito, contendo $3,23 \times 10^3$ PFU/mL. Esse sobrenadante viral foi administrado em 26 animais e 2 foram reservados para servirem como animais sentinelas (animais não infectados). Os animais infectados e o grupo sentinela foram mantidos em gaiolas individuais e observados diariamente.

Para estudos histopatológicos e imunohistoquímicos da fase aguda da infecção primária (Ag.1) a cada 24 horas (hs) por um período de sete dias, um primata infectado foi anestesiado (0,2 mL de Zoletil 100 – Virbac, via intramuscular) e sacrificado por hipovolemia, após punção cardíaca, sendo imediatamente submetidos a necropsia para a retirada do fígado que foi fixado em formalina tamponada a 10% por 24 horas e depois em álcool a 70% até o processamento.

Para estudo da fase convalescente da infecção primária (Conv.1) foi realizado o mesmo procedimento para coleta de fígado descrito acima, porém, em intervalos de 15, 20, 30, 45 e 60 dias pós-inoculação (dpi). Na última coleta da cinética da infecção primária, com 60 dias p.i., além da coleta da amostra do primata infectado, foi coletado o fígado do primata sentinela (sentinela 1).

2.3.2. Infecção Secundária

Após a cinética da infecção primária, os animais infectados com o VDEN-3 não sacrificados, foram reinoculados experimentalmente com sobrenadante de células C6/36 infectadas pelo VDEN-2, com a dose de 0,5 mL via subcutânea à altura do 3º espaço intercostal direito, contendo $4,47 \times 10^4$ PFU/mL. Essa suspensão viral foi administrada nos 13 animais restantes da infecção primária. O animal sentinela restante foi preservado sem infecção até o final do último dia do experimento. Os animais infectados e o animal sentinela serão observados diariamente.

Para estudos histopatológicos e imunohistoquímicos da fase aguda da infecção secundária (Ag.2) a cada 24 horas (hs) por um período de sete dias, um primata infectado foi anestesiado (0,2 mL de Zoletil 100 – Virbac, via intramuscular) e sacrificado por hipovolemia, após punção cardíaca, sendo imediatamente submetidos a necropsia para a retirada do fígado que foi fixado em formalina tamponada a 10% por 24 horas e depois em álcool a 70% até o processamento.

Para estudos da fase convalescente da infecção secundária (Conv.2) foi realizado o mesmo procedimento para coleta de fígado descrito anteriormente, porém, em intervalos de 15, 20, 30, 45 e 60 dpi. Na última coleta da cinética da infecção secundária, com 60 dias p.i., além da coleta da amostra do primata infectado, foi coletado o fígado do primata sentinela (sentinela 2).

2.4 CONFIRMAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO

A suscetibilidade à infecção experimental por vírus dengue nos PNH em estudo foi confirmada através da detecção de antígenos do vírus dengue no fígado dos primatas infectados durante a cinética experimental e/ou detecção de anticorpos (Ferreira, 2012).

2.5 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO

As amostras de fígado foram fixadas durante 24h em solução de formalina tamponada a 10% e mantidas em álcool etílico para o processamento histopatológico, que consistiu: na passagem do tecido em diversas soluções crescentes de álcool, iniciando com álcool a 70% até o álcool absoluto (100%). Posteriormente, foram realizadas duas passagens em xilol a TA, seguida da imersão em dois banhos de parafina a 60°C. Por fim, a inclusão e formatação das amostras em blocos de parafina que, depois de resfriados, foram seccionados utilizando micrótomo rotativo (Jung Histocult 820- Leica), para obtenção de cortes de 5µm de espessura, que foram corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE), Pelrs (Azull da Prússia), Picrossírius e Reticulina.

A análise histopatológica foi conduzida por dois observadores que desconheciam a identificação de cada caso em microscopia de luz nos aumentos de 40x, 100x, 200x e 400x. Foi utilizado fotomicroscópio modelo NiU (Nikon, Japão) com câmera digital DS-U3 (Nikon, Japão) acoplada para documentação fotográfica.

A análise microscópica inicial foi conduzida considerando alterações hepatocelulares, estruturais e circulatórias, tais como: degeneração vacuolar micro e macrogoticular (esteatose), tumefação, morte celular (apoptose, necrose individual, focal, zonal, interface ou massiva), alterações da estrutura como colapso da trama de reticulina, fibrose, inflamação lobular (zonal, multifocal, disseminada, confluyente), portal, de ducto biliar e interface; tipos de células inflamatórias participantes

(linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, histiócitos, eosinófilos), alterações das células de Küpffer, colestase em canaliculos biliares/ hepatócitos, ductos biliares, proliferação ductular, perda de ductos biliares; depósitos de hemossiderina (hepatócitos e células de Küpffer no lóbulo, e em macrófagos portais) e alterações circulatórias (congestão, hemorragia).

O diagnóstico morfológico das alterações hepáticas foi individual para cada animal e esses resultados foram apresentados na forma de quadro. As alterações histopatológicas também foram descritas por fases da infecção primária e secundária, bem como, tiveram documentação fotográfica para essas fases.

A análise semi-quantitativa foi realizada em relação à localização e ao grau de lesão presente, foi atribuído escore que variou de zero a três, sendo zero considerado padrão de histologia normal ou ausência da lesão; 1 para lesão discreta, 2, para moderada e 3 para marcante. A localização das lesões foi considerada segundo cada zona hepática. O quadro 2 apresenta os parâmetros que foram analisados semiquantitativamente, assim como a caracterização dos escores usados.

Quadro 2 – Parâmetros e caracterização dos escores utilizados para a análise morfológica do fígado utilizando coloração de HE, Perls, Picrossírius e Reticulina.

Parâmetros *	Descrição dos escores
Apoptose Hepatócitos	0: \leq 3 células; 1: 4 a 14 células; 2: 15 a 28 células; 3: \geq 28 células. Análise em \geq 50 campos/40x.
Necrose Hepatocelular	0: \leq 3 células; 1: 4 a 14 células; 2: 15 a 28 células; 3: \geq 28 células. Análise em \geq 50 campos/40x.
Necrose Lobular	0: ausência; 1: lesão se estende 1/3 da VHC ao espaço porta; 2: lesão se estende 2/3 da VHC ao espaço porta; 3: lesão se estende por todo o ácino. Análise em \geq 50 campos/40x
Tumefação	0: ausência; 1: lesão se estende 1/3 da VHC ao espaço porta; 2: lesão se estende 2/3 da VHC ao espaço porta; 3: lesão se estende por todo o ácino. Análise em \geq 50 campos/40x
Esteatose	0: ausência; 1: lesão se estende 1/3 da VHC ao espaço porta; 2: lesão se estende 2/3 da VHC ao espaço porta; 3: lesão se estende por todo o ácino. Análise em \geq 50 campos/40x
Hiperplasia de células de Küpffer	0: ausência; 1: 3 a 5 células/campo; 2: 6 a 10 células/campo; 3: $>$ 10 células/campo. Análise em \geq 50 campos/40x
Hemossiderina	0: ausência; 1: 3 a 5 células/campo; 2: 6 a 10 células/campo; 3: $>$ 10 células/campo. Análise em \geq 50 campos/40x
Infiltrado Inflamatório Lobular	0: até 3 focos de células inflamatórias; 1: 4 até 15 focos de células inflamatórias; 2: 16 até 50 focos de células inflamatórias; 3: acima de 50 focos de células inflamatórias. Análise em \geq 50 campos/40x.

Continuação

Parâmetros *	Descrição dos escores
Infiltrado Inflamatório Portal	0: raras células inflamatórias; 1: poucas células inflamatórias; 2: moderado número de células inflamatórias; 3: intenso número de células inflamatórias. Análise em 10 EP aleatórias.
Infiltrado Inflamatório VHC	0: ausência de células inflamatórias; 1: poucas células inflamatórias; 2: moderado número de células inflamatórias; 3: intenso número de células inflamatórias. Análise em 10 VHC aleatórias.
Lesão na Trama Reticulínica	0: ausência de colapso; 1: poucos focos de necrose; 2: moderado focos de necrose; 3: lesão se estende por todo o ácino. Análise em ≥ 50 campos/40x
Hemorragia	0: ausência ; 1: discretos focos; 2: moderado número de focos; 3: marcante. Análise em ≥ 50 campos/40x.
Congestão	0: ausência de alteração; 1: pouca alteração; 2: moderada alteração; 3: intensa alteração. Análise em ≥ 50 campos/40x.
Proliferação Ductular	0: ausência de alteração; 1: pouca alteração; 2: moderada alteração; 3: intensa alteração. Análise em ≥ 50 campos/40x.
Fibrose	0: ausência de alteração; 1: pouca alteração; 2: moderada alteração; 3: intensa alteração. Análise em ≥ 50 campos/40x.

* Adaptado de Aye *et al.*, 2014 e de Huerre *et al.*, 2001 por L.R.M. Sá.

Para avaliar a intensidade da lesão hepática em cada animal, bem como, cada fase da infecção primária e secundária, foi realizada a média da somatória dos escores de todos os parâmetros avaliados. A partir da obtenção dessas médias foram realizadas comparações entre cada primata infectado com o respectivo animal sentinela, bem como, entre as fases da infecção primária e secundária, sendo essas fases também comparadas aos animais sentinelas.

Com o intuito de avaliar se as lesões observadas nos grupos podem ser caracterizadas como hepatite, foi realizada em cada grupo a média da somatória dos escores de alguns parâmetros como: morte celular (apoptose e necrose de hepatócitos), inflamação (acinar, EP e VHC) e tumefação celular. Para esses parâmetros foram atribuídos escores específicos (quadro 3) (adaptado de Ishak, 1995), levando em consideração a importância patológica desses eventos na evolução para uma hepatite (adaptado Benet *et al.*, 1999).

Quadro 3 – Alterações histológicas com escores específicos de acordo com a importância patológica

Parâmetro	Escore*
Apoptose de hepatócitos	3
Necrose lítica	3
Inflamação acinar	2
Inflamação EP	2
Inflamação VHC	2
Tumefação	1

* Adaptado de Ishak, 1995 e de Benet *et al.*, 1999 por D.F.Henriques.

2.6. IMUNOHISTOQUÍMICA

Os blocos de tecidos em parafina foram usados para obter cortes de 5 µm que, em seguida, foram desparafinados, fixados em lâminas “super-frost” e processados para detecção de antígenos virais específicos de Dengue pelo método da fosfatase alcalina usando anticorpo policlonal (anti-VDEN 2) e um anticorpo controle negativo (Hall *et al.*, 1991; Xiao *et al.*, 2001). Os antígenos específicos identificados foram semi-quantificados por campo microscópico usando uma escala de 0 a 4 cruzes (+), sendo que 0 = ausência de antígenos; 1 + = presença de uma a duas células expressando antígenos virais; 2 + = presença de 3-5 células expressando antígenos virais; 3 + = presença de 6-10 células expressando antígenos específicos; e 4 + = presença de mais de 10 células expressando antígenos específicos em área ocupada por 10 campos histológicos de 400 x (Quaresma *et al.*, 2005; Quaresma, *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007).

2.6.1. Análise da resposta imune no fígado

Nos fragmentos de fígados dos animais foram realizadas pesquisas sobre a resposta imunológica celular e citocínica.

Para determinação imunofenotípica e expressão de citocinas “in situ” nas lesões, os fígados foram processados seguindo a metodologia descrita por HSU *et al.* (1981), parcialmente modificada e padronizada, desenvolvida no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a técnica consiste em : (I) desparafinização dos cortes em banhos de xilol; (II) seguido de hidratação dos cortes em sequência decrescente de etanol; (III) bloqueio da peroxidase endógena

em solução de água oxigenada 3% em câmara escura e exposição dos antígenos com tampão Retrieval pH 9,0 ou 7,2, ou 6,0 conforme pré-estabelecido para o anticorpo, a 95^o C em banho-Maria; (IV) bloqueio das proteínas inespecíficas, incubando os cortes com leite desnatado 10% em água destilada; (V) incubação com anticorpo primário diluído em albumina bovina (BSA) 1%, “over-night” a 4^o C; (VI) seguido de incubação com anticorpo anti a espécie animal do anticorpo primário; (VII) incubação com o complexo estreptavidina-biotina ou sistema de polímeros, conforme padronização prévia; (VIII) revelação com 3,3 diaminobenzidina, 45 mg em PBS, acrescido de 1,2 mL de água oxigenada 3%; (IX) coloração com hematoxilina; (X) desidratação em sequência crescente de etanol, após secarem a montagem foi realizada com resina Permount. Entre as etapas, as lâminas foram lavadas em água corrente e/ou água destilada.

O painel de anticorpos que foram utilizados, juntamente com a diluição estabelecida e o sistema de detecção, está apresentado no quadro 4. Nas amostras em estudo foram utilizados anticorpos específicos para material humano, com a padronização rotineira utilizada pelo laboratório do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP. Foi determinada a utilização como controles das reações imuno-histoquímicas tecidos humanos comprovadamente positivos para os imunomarcadores selecionados e linfonodo de PNH da espécie *Callithrix jacchus*.

A obtenção de positividade nos fragmentos de linfonodo de saguis da espécie *Callithrix jacchus* atestou que os anticorpos humanos selecionados com diluições pré-estabelecidas, poderiam ser empregados no material deste estudo.

O padrão de marcação imuno-histoquímico foi analisado através da quantificação dos anticorpos nas células imunomarcadas para apoptose, para cada fenótipo celular e expressão de citocinas para cada PNH. Essa contagem foi realizada em microscopia óptica utilizando retículo graduado com 1 cm², cuja área é 0,0625 mm² sob objetiva de 400x. As células imunomarcadas foram contadas em 10 ácinos hepáticos por lâmina, sendo dividido: 10 campos para zona 1 (periportal), 8 a 10 campos para zona 2 (mediozonal) e 10 campos para zona 3 (centrolobular), além de campos referentes a 5 EP e 5 VHC. Foi calculada a média de células por campo em cada área por imunomarcador pesquisado e o total de células por área foi obtido dividindo esse valor médio pela área de 0,0625mm². Posteriormente, do valor médio obtido para cada animal (mm²) por imunomarcador, calculo-se a média por grupos correspondentes as fases das infecções: Ag.1, Conv1, Ag.2 e Conv.2.

Quadro 4 – Painel de anticorpos e sistema de detecção utilizados nas reações de imuno-histoquímica em fígados de saguis.

Anticorpos primários*	Espécie Animal**	Diluição	Código do Fabricante	Sistema de detecção	Fonte	Principais funções
Anti-Lisozima	Coelho	1:2000	Dako/A0099	NovolinK	Derivados das células tronculares da medula óssea.	Fagocitose de partículas estranhas e a apresentação de antígenos para os LT- auxiliares.
Anti – CD57	Camundongo	1:50	Neomarkes/ MS-136-P	NovolinK	Derivados das células tronculares da medula óssea.	Destruir células parasitadas por vírus e células neoplásicas, através da ativação da apoptose.
Anti – S100	Coelho	1:800	Dako/Z0311	Novolink	Derivam dos precursores medulares.	Eficientes na apresentação de antígenos aos LT- auxiliares
Anti LB – CD20	Camundongo	1:300	Dako/M755	Novolink	Derivados das células tronculares da medula óssea.	LB ativados proliferam e se diferenciam em plasmócitos, que produzem uma grande quantidade de anticorpos específicos contra o agente agressor envolvido.
Anti LT- CD4	Camundongo	1:40	Novocastra/ NCL-L-CD4-1F6	Novolink	Derivados das células tronculares da medula óssea.	Secreção de citocinas e colaboram com os LB na produção de anticorpos.
Anti –TNF- alfa	Cabra	1:20	R&D systems/ AF210NA	LSAB	Macrófagos, LT, células NK, células endoteliais e queratinócitos.	Aumenta a expressão de MHC I; Estimula: recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção, células endoteliais e macrófagos a secretar quimiocinas que acentuam a afinidade das integrinas por seus ligantes.
Anti – IFN- gama	Camundongo	1:30	R&D systems/ MAB285	Novolink	Células T citotóxicas e NK.	Protege contra infecções virais e promovem imunidade mediada por células contra microorganismos intracelulares. Sintetiza várias enzimas que interferem com a transcrição do RNA ou DNA viral e replicação. Acentua a apresentação de antígeno via MHC e aumento dos ligantes que as células T reconhecem. Aumento da atividade citotóxica das células NK. Promove diferenciação de células T CD4 ⁺ “naives” para células típicas da resposta inata e inibe proliferação de células características da resposta humoral.

Anticorpos primários*	Espécie Animal**	Diluição	Código do Fabricante	Sistema de detecção	Fonte	Principais funções
Anti-TGF-beta	Coelho	1:400	Santa Cruz/ SC 82	Novolink	Linfócitos e macrófagos.	Inibe a citotoxicidade e produção de anticorpos (exceto IgA). Induz a proliferação de células CD8, ampliação da maturação de linfócitos T e células de memória.
Anti – IL8	Cabra	1:25	R&D systems/ AF 208NA	Novolink	Macrófagos, fibroblastos, plaquetas e LT.	Envolvida na inflamação e na migração celular, principalmente de monócitos e células T. Induz a quimiotaxia de neutrófilos e LT.
Anti – IL10	Camundongo	1:10	R&D systems/ MAB217	LSAB	Macrófagos e LT.	Inibe a produção de IFN-gama, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF. Inibe a apresentação antigênica. Aumenta a resposta humoral induzindo a diferenciação para plasmócitos.
Anti-VCAM1	Cabra	1:300	R&D systems/ BBA19	LSAB	Membro da superfamília das imunoglobulinas (ligante de integrina). Expressa em vasos sanguíneos após as células endoteliais serem estimuladas por citocinas.	Facilitar a migração transendotelial dos leucócitos em um processo inflamatório.
Anti-CD95	Camundongo	1:30	Dako/ M 3555	Hidref	O Fas (CD95/APO-1) é uma glicoproteína transmembrana do tipo 1 pertencente à família do TNF e expressa em diversas linhagens de tecidos dentre eles as células hepáticas.	O receptor Fas ativado leva a morte celular programada (apoptose). Uma das vias de apoptose.

* imunoglobulinas para material humano. ** anticorpos monoclonais/camundongo, anticorpos policlonais/coelho e cabra. LT= linfócito T, LB = linfócito B.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas comparativas dos dados obtidos com o estudo histopatológico foi utilizado o programa SPSS (versão 8.0) (SPSS, 1999). Os dados apresentaram uma distribuição normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* (p -valor $> 0,05$), desta forma, usou-se o teste *Repeated Measure Anova* para todas as comparações apresentadas a seguir, e a fim de verificar médias duas a duas, usou-se o teste de *Tukey*. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Os dados quantitativos obtidos com a análise da resposta imune por imunohistoquímica foram apresentados como média \pm desvio padrão, seguido por análises estatísticas comparativas através do programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007). Os dados apresentaram uma distribuição normal, pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* (p -valor $> 0,05$), desta forma, para todas as comparações apresentadas usou-se o teste *Repeated Measure Anova* (dois critérios) com o pós-teste Bonferroni, admitindo significância estatística para $p \leq 0,05$.

Os gráficos da análise exploratória dos dados apresentados neste estudo foram produzidos utilizando o GraphPadPrism 6.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 DETECÇÃO DE ANTÍGENO VIRAL

A presença de antígeno viral foi observada (figura 9), através da imunohistoquímica, no fígado de todos os primatas infectados com VDEN durante infecção primária e secundária, com exceção do primata analisado no 20º dpi secundária, entretanto, esse animal apresentou no soro anticorpos IgM anti-VDEN-2 (resposta monotípica), bem como, anticorpos IH anti-VDEN-2 (reação cruzada para os outros sorotipos) (Ferreira, 2012). Após semi-quantificação foi observada leve (1+) a muito intensa (4+) presença de células expressando antígenos virais predominantemente em Z2 e Z3, por vezes observado em Z1 (Quadro 5).

Quadro 5 – Semi-quantificação de antígenos do VDEN em fígado dos primatas em estudo

Dia pós-inoculação	Deteção de antígeno infecção primária VDEN-3	Deteção de antígeno infecção secundária VDEN-2
1º	+	+++
2º	+	++
3º	++++	+
4º	++++	++++
5º	++++	+++
6º	++++	+++
7º	++++	+
15º	++++	+
20º	+	0
30º	+++	++++
45º	+	++
60º	++++	+++
Sentinela	0	0

Legenda: 0 = ausência de antígenos; + = presença de uma a duas células expressando antígenos virais; ++ = presença de 3-5 células expressando antígenos virais; +++ = presença de 6-10 células expressando antígenos específicos; e ++++ = presença de mais de 10 células expressando antígenos específicos em área ocupada por 10 campos histológicos de 400x.

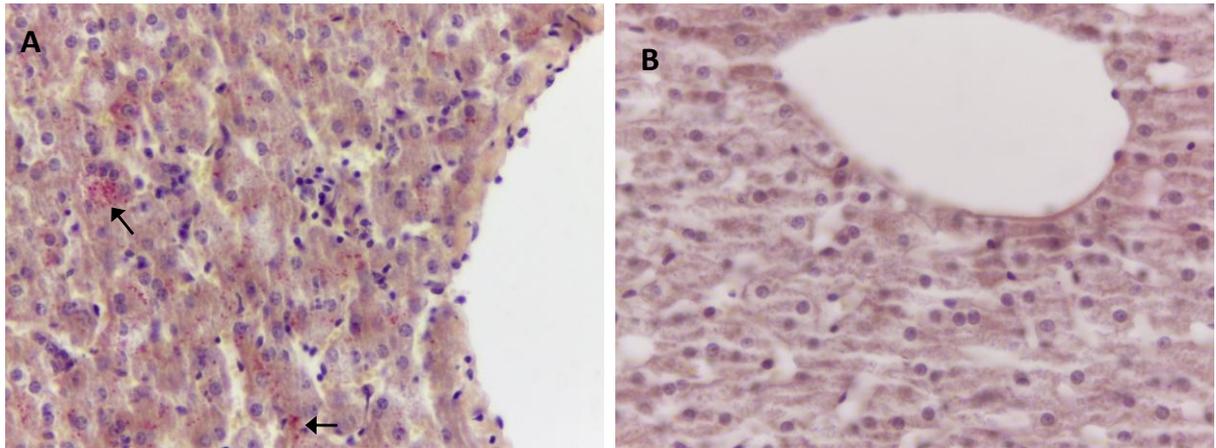


Figura 9: Imunohistoquímica em cortes de fígado de PNH da espécie *Callithrix penicillata*. A positividade é caracterizada pela coloração alaranjada no tecido (setas). **A.** Imunohistoquímica de tecido hepático de sagui infectado com VDEN-3 demonstrando hepatócitos imunomarcados (400X); **B.** Imunohistoquímica de tecido hepático do animal sentinela 1 (sagüi não infectado) (400x).

3.2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os resultados da avaliação histopatológica semiquantitativa, infecção primária e infecção secundária, estão apresentados nos Apêndices B e C respectivamente. Os diagnósticos morfológicos das alterações observadas durante a infecção primária e secundária estão apresentados nos Apêndices D e E respectivamente. Seguem abaixo a descrição histopatológica e as análises estatísticas.

3.2.1 Descrição Histopatológica

3.2.1.1 Fase Aguda da Infecção primária (Ag.1)

Durante análise histológica nos fígados dos primatas coletados na Ag.1 observou-se morte celular multifocal, variando de discreto a moderado grau de lesão, com tendência para Z2 e Z3, caracterizadas por necrose lítica de hepatócitos e corpúsculos de Coulciman do 1º ao 6º dpi (figura 10 – A e B), além de discreto infiltrado inflamatório lobular em Z2 e Z3 (linfócitos, macrófagos, neutrófilos e megacariócitos), portal (linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos) (figura 11 - A) e centrolobular (macrófagos e linfócitos) em todos os primatas desta fase (figura 11 - B). No 3º dpi foram observados discretos focos de esteatose macrovesicular com predileção por zona 2 (figura 10 - C). Também foram observadas discretas a intensas lesões no tecido hepático, tais como: tumefação celular que compromete todo o ácino do 1º ao 7º dpi; hiperplasia, hipertrofia de células de Kúpffer do 1º ao 5º

dpi e hemossiderina em küpffer no 3^o, 5^o e 6^o dpi com predominância em Z2 e Z3 (figura 10 - F). Dilata o sinuzoidal também foi observada durante esta fase (figura 10 - *).

3.2.1.2 Fase Convalescente da Infec o primária (Conv.1)

Na Conv.1 foram observados discretos focos de necrose lítica com tendência para Z2, além de discreto infiltrado inflamatrio lobular (linfócitos e macrófagos) e centrolobular (linfócitos e macrófagos) no fígado dos primatas coletados no 15^o e 60^o dpi. Inflama o portal discreta (linfócitos) foi observada apenas no 45^o dpi. Discreta esteatose microvesicular com predile o por Z2 foi observada no 60^o dpi. Tumefac o celular que comprometeu áreas Rappaport ou o ácino como um todo foi observada em todos os primatas desta fase, variando de discreto a intenso o grau de lesão. Moderada a intensa hiperplasia e hipertrofia de Küpffer foi observada no 20^o e no 60^o dpi (figura 10 – E), sendo este último associada   moderada hemossiderina em küpffer em Z2. Discreta altera o hepatocitária regenerativa também foi observada no 20^o e no 60^o dpi, caracterizada por regenera o binucleada, não havendo predominância de distribui o entre as zonas (figura 11 - C).

3.2.1.3 Animal Sentinela 1

O primata não infectado que serviu de sentinela na cinética da infec o primária, durante análise histológica apresentou raros focos de células inflamatrias (≤ 3 focos, linfócitos) e discreta tumefac o que se estende 1/3 da VHC ao espaço porta, correspondendo a zona 2.

3.2.1.4 Fase Aguda da Infec o secundária (Ag.2)

Durante análise histológica nos fígados dos primatas coletados na Ag.2 observou-se discretos focos de necrose lítica com tendência para Z2, associada   discreta inflama o lobular (linfócitos, macrófagos e neutrófilos) em todos os primatas. Foi observada discreta a moderada Inflama o portal (linfócitos, neutrófilos e macrófagos) no 3^o e 4^o dpi, enquanto discreta inflama o centrolobular (linfócitos e macrófagos) foi observada no 3^o, 4^o e 7^o dpi. No 2^o dpi foi observada discreta

esteatose microvesicular em Z2. Também foram observadas discretas a intensas lesões no tecido hepático, tais como: tumefação celular que compromete o ácino todo do 1º ao 7º dpi e hiperplasia, hipertrofia de Küpffer no 1º, 2º, 3º e 6º dpi. Discreta a moderada Hemossiderina em Küpffer com predileção por Z2 foi observada no 2º, 3º, 6º e 7º dpi.

3.2.1.5 Fase Convalescente da Infecção secundária (Conv.2)

Os fígados dos primatas coletados na Conv.2 apresentaram em análise histológica discretos focos de necrose lítica com tendência para Z2 no 30º e 45º dpi, além de discreto infiltrado inflamatório lobular (linfócitos e macrófagos) do 30º ao 60º dpi, portal (linfócitos) do 45º ao 60º dpi e centrolobular (linfócitos e macrófagos) no 30º e 60º dpi. Discreta esteatose microvesicular com predileção por Z3 foi observada no 15º dpi (figura 10 – D) e discreta hemossiderina em Küpffer na Z2 foi observada no 45º dpi. Tumefação celular que comprometeu áreas Rappaport ou o ácino como um todo foi observada em todos os primatas desta fase, variando de discreto a moderado o grau de lesão.

3.2.1.6 Animal Sentinela 2

O primata não infectado que serviu de sentinela na cinética da infecção secundária, durante análise histológica apresentou raros focos de células inflamatórias (≤ 3 focos, linfócitos e macrófagos) e moderada a intensa tumefação que se estende por todo o ácino.

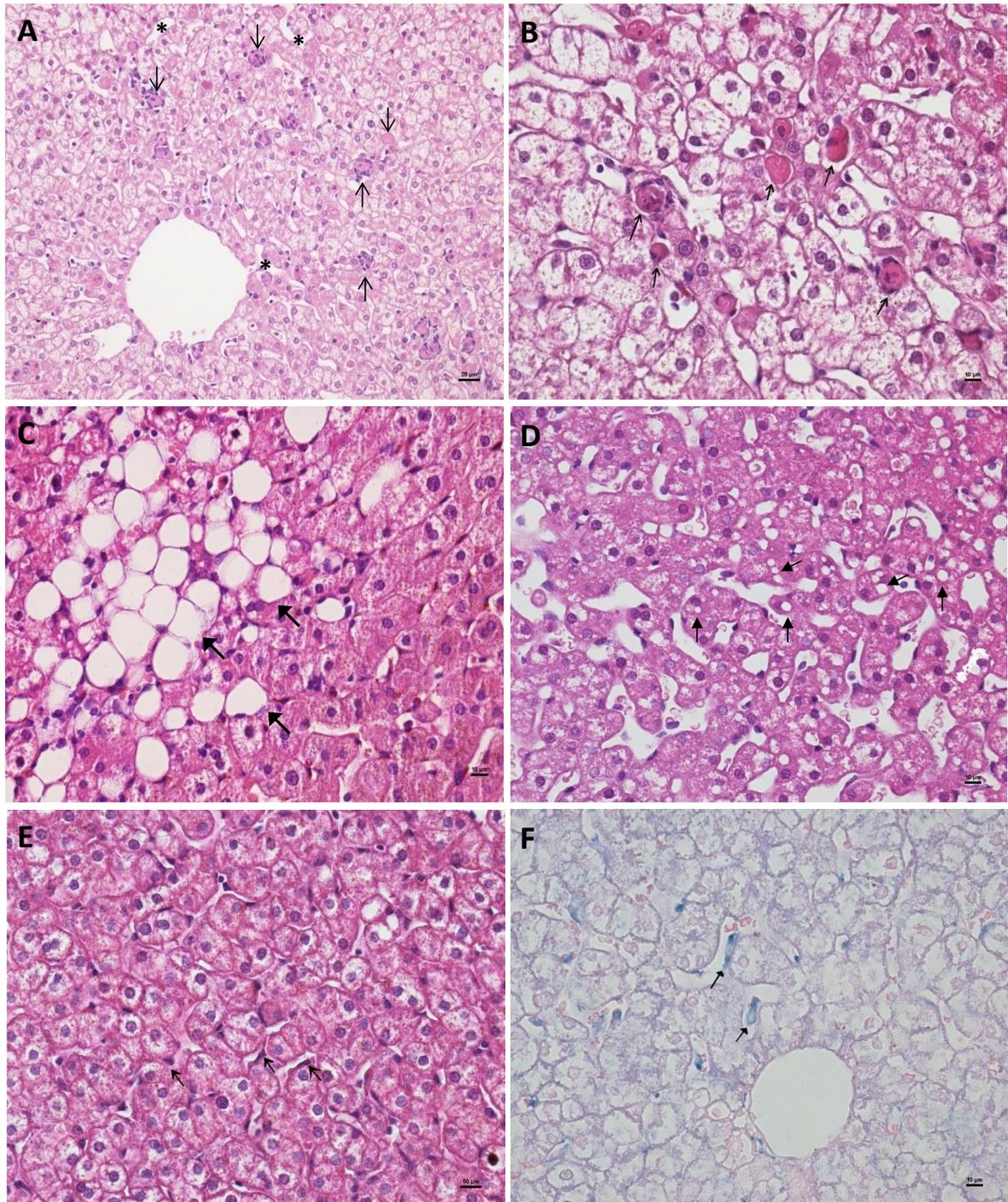


Figura 10: Fotomicrografia do fígado de PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados com VDEN. **A.** Fígado apresentando morte celular (corpúsculos de Coulciman e necrose lítica) de hepatócitos (setas) e dilatação de sinusóide (*), 2 dpi primária, HE, 200x; **B.** Fígado apresentando morte celular (corpúsculos de Coulciman e necrose lítica) de hepatócitos (setas), 6 dpi primária, HE, 400x; **C.** Fígado apresentando esteatose macrogoticular nos hepatócitos (setas), 3 dpi primária, HE, 400x; **D.** Fígado apresentando esteatose microgoticular nos hepatócitos (setas), 15 dpi secundária, HE, 400x; **E.** Fígado apresentando hiperplasia/hipertrofia de células de Kupffer (setas), 2 dpi secundária, HE, 400x; **F.** Fígado apresentando hemossiderina em Kupffer (setas), 5 dpi primária, Perls, 400x.

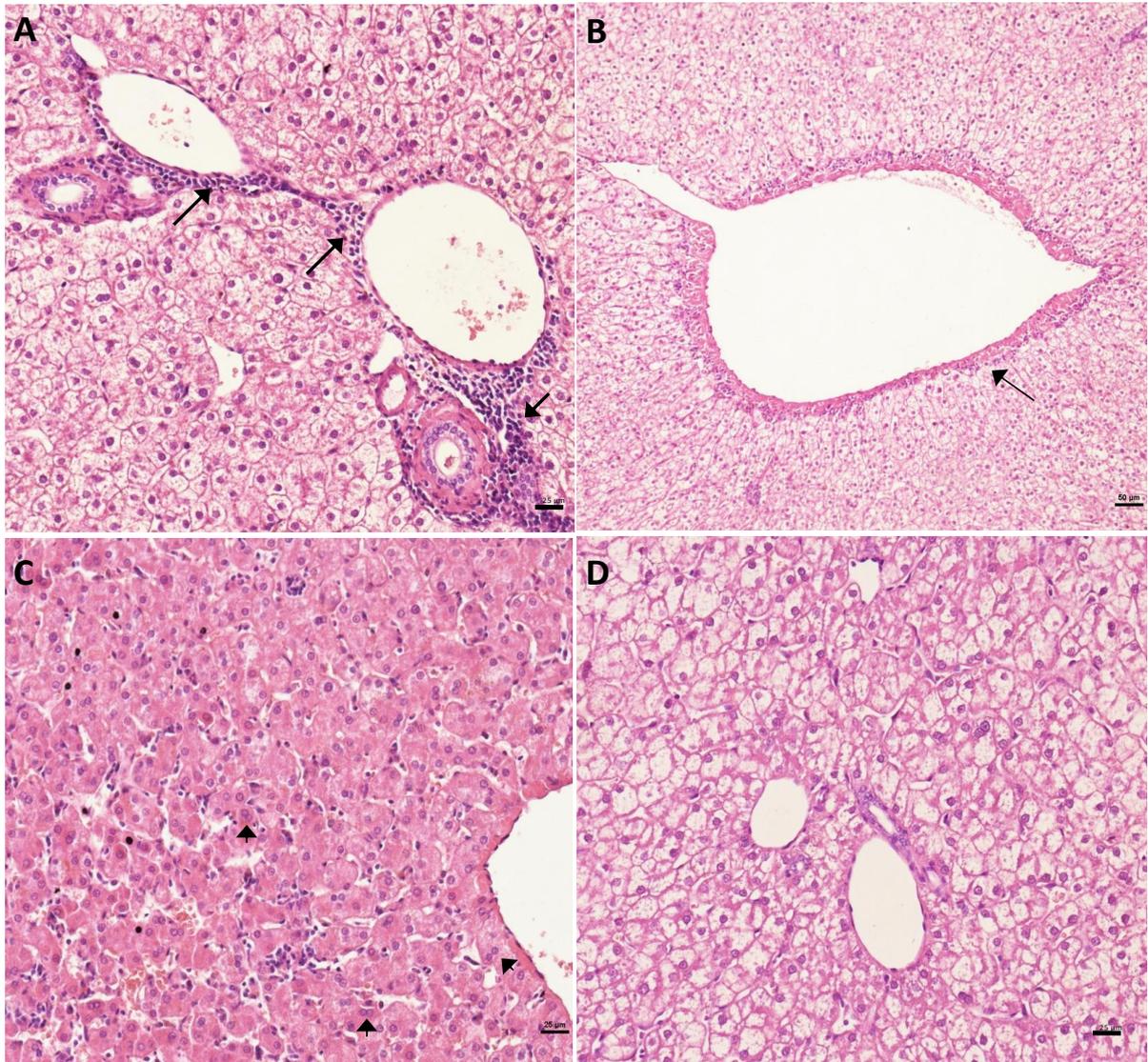


Figura 11: Fotomicrografia do fígado de PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados com VDEN. **A.** Fígado apresentando infiltrado inflamatório no espaço porta (seta), 5 dpi primária, HE, 400x; **B.** Fígado apresentando infiltrado inflamatório na veia hepática central (seta), 5 dpi primária, HE, 200x; **C.** Fígado apresentando alteração hepatocitária regenerativa, regeneração binucleada (seta), 60 dpi primária, HE, 200x; **D.** Histologia do fígado do animal sentinela 2, HE, 200x.

3.2.2 Análise Estatística

3.2.2.1 Infecção Primária

As análises estatísticas dos parâmetros histopatológicos avaliados na Ag.1 mostraram diferença significativa entre tumefação celular e esteatose quando comparado entre si e aos demais parâmetros, exceto ao comparar esteatose com necrose e hemossiderina. Também foi observada diferença significativa entre apoptose quando comparada com necrose lítica, bem como, hiperplasia/hipertrofia de Kupffer quando comparada com necrose. Nas demais comparações não foram observadas diferenças estatísticas significantes (figura 12A). Durante a Conv.1 foi observada diferenças significantes apenas entre tumefação celular e hiperplasia/hipertrofia de Kupffer quando comparadas com os demais parâmetros, exceto ao comparar hiperplasia/hipertrofia de Kupffer com VHC (figura 12B).

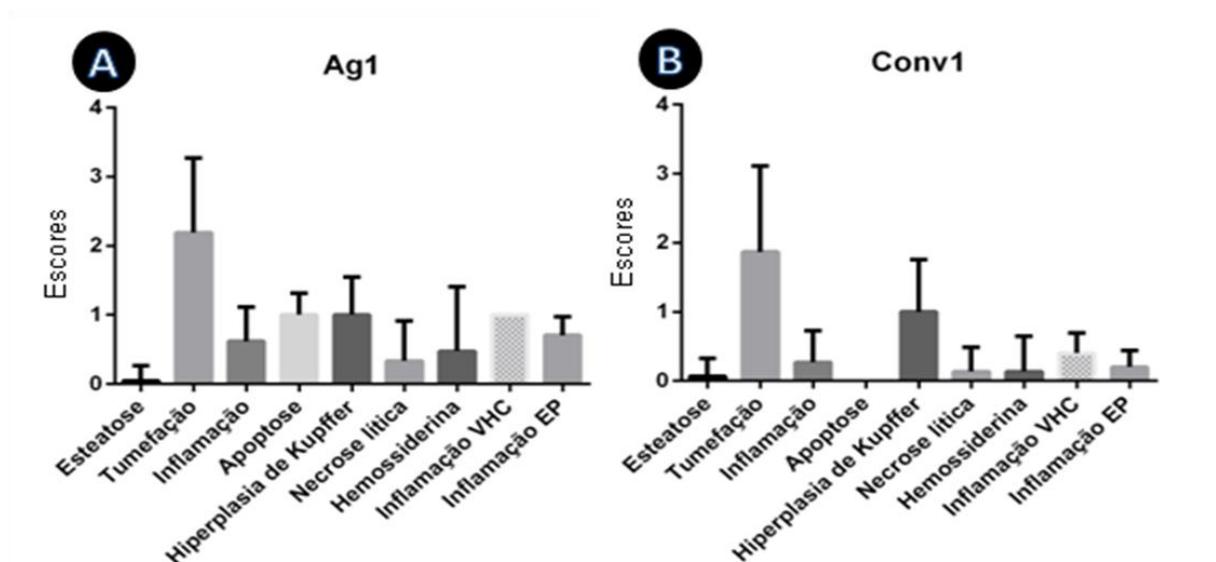


Figura 12: Semiquantificação das alterações do fígado durante as fases da infecção primária; (A) Semiquantificação das alterações do fígado na fase aguda da infecção primária; (B) Semiquantificação das alterações do fígado na fase convalescente da infecção primária.

Legenda: 0 a 4 = escores dos parâmetros avaliados durante análise histopatológica. Ag1 = fase aguda da infecção primária; Conv1 = fase convalescente da infecção primária.

A análise estatística da Ag.1 evidenciou forte significância ($p \leq 0,05$) na distribuição das lesões como necrose lítica e inflamação acinar pela zona 2 quando comparadas às demais zonas do ácino hepático. Na análise da Conv. 1 não foram observadas lesões com preferência significativa por alguma zona acinar ($p \geq 0,05$).

Quando comparados os parâmetros avaliados entre Ag. 1 e Conv. 1, foi observada diferença significativa com predominância na Ag. 1 para Necrose ($p < 0,000$), Apoptose ($p < 0,001$), inflamação Acinar ($p < 0,000$), centrolobular ($p < 0,006$) e portal ($p < 0,043$).

Na análise estatística dos parâmetros avaliados na Ag. 1 quando comparados ao animal sentinela mostrou forte diferença significativa com prevalência da Ag. 1 para Necrose ($p < 0,003$), Apoptose ($p < 0,001$), inflamação Acinar ($p < 0,000$), inflamação centrolobular ($p < 0,000$), inflamação portal ($p < 0,001$), Hemossiderina em Küpffer ($p < 0,000$), Hiperplasia/hipertrofia de Küpffer ($p < 0,000$) e Tumefação celular ($p < 0,001$).

Foi observada diferença significativa entre a Conv 1 quando comparada ao animal sentinela, sendo prevalente na Conv. 1 para os seguintes parâmetros: Necrose ($p < 0,053$), inflamação Acinar ($p < 0,014$), inflamação centrolobular ($p < 0,013$), inflamação portal ($p < 0,04$), Hemossiderina em Küpffer ($p < 0,054$), Hiperplasia/hipertrofia de Küpffer ($p < 0,043$) e Tumefação celular ($p < 0,001$).

Quando analisado cada primata infectado pertencente à cinética da infecção primária, levando em consideração a média da somatória dos escores de todos os parâmetros avaliados, foram observadas diferenças significantes em todos os primatas, quando comparada com o animal sentinela 1, exceto no primata com 30 dpi (figura 13).

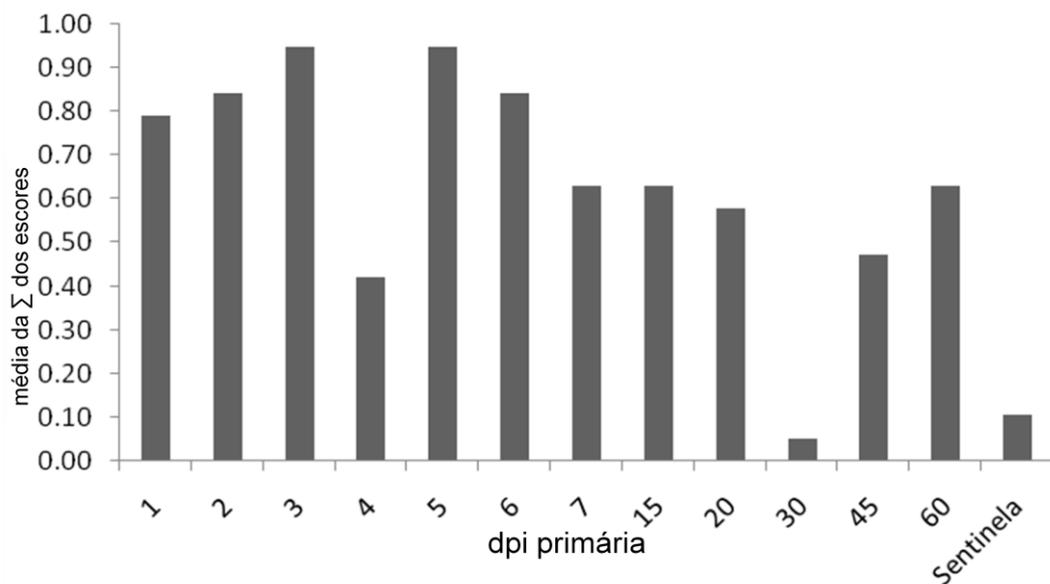


Figura 13: Semiquantificação das alterações no fígado de PNH durante a cinética da infecção primária.

Legenda: 0.00 a 1.00 = média da somatória do escores de todos os parâmetros avaliados durante análise histopatológica; dpi primária = dia pós-inoculação primária.

3.2.2.2 Infecção Secundária

Quando analisados estatisticamente os parâmetros histopatológicos avaliados na Ag.2 foram observadas diferenças significantes entre tumefação celular e hiperplasia/hipertrofia de K upffer quando comparados com os demais parâmetros ($p > 0,05$) (figura 14A). Também foi observada diferença significativa durante a Conv. 2 apenas entre tumefação celular quando comparadas com os demais parâmetros (figura 14B). As outras comparações realizadas para esta fase da infecção secundária não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

Através da análise estatística da Ag. 2 o infiltrado inflamatório acinar, a necrose lítica e a hemossiderina em K upffer mostraram distribui o preferencialmente significativa pela zona 2 quando comparadas às demais zonas do ácino hepático ($p \leq 0,05$), enquanto na Conv. 2 apenas o infiltrado inflamatório acinar apresentou preferência significativa pela zona 2 ($p \leq 0,05$).

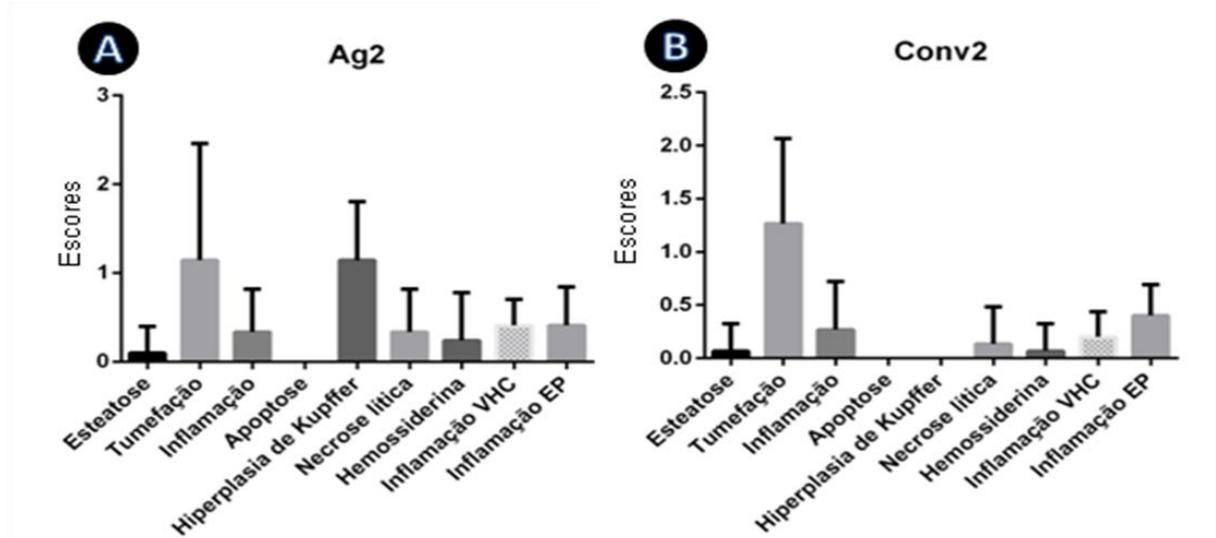


Figura 14: Semiquantificação das alterações do fígado durante as fases da infecção secundária; (A) Semiquantificação das alterações do fígado na fase aguda da infecção secundária; (B) Semiquantificação das alterações do fígado na fase convalescente da infecção secundária. Legenda: 0 a 3 e 0.0 a 2.5 = escores dos parâmetros avaliados durante análise histopatológica. Ag2 = fase aguda da infecção secundária; Conv2 = fase convalescente da infecção secundária.

Os parâmetros avaliados na Ag. 2 quando comparados com Conv. 2 apresentaram diferença significativa com predomínio na Ag. 2 para Necrose ($p < 0,000$), inflamação Acinar ($p < 0,000$), Hemossiderina em Küpffer ($p < 0,004$) e Hiperplasia/hipertrofia de Küpffer ($p < 0,043$).

Na análise estatística entre Ag. 2 e o animal sentinela foi observado forte diferença significativa com prevalência na Ag. 2 para os seguintes parâmetros: Necrose ($p < 0,002$), inflamação Acinar ($p < 0,001$), inflamação centrolobular ($p < 0,003$), inflamação portal ($p < 0,004$), Hemossiderina em Küpffer ($p < 0,001$) e Hiperplasia/hipertrofia de Küpffer ($p < 0,001$). Tumefação celular apresentou diferença significativa com predominância no animal sentinela ($p < 0,003$).

Quando comparada a Conv. 2 com o animal sentinela a análise estatística mostrou diferença significativa com predomínio da Conv. 2 para Necrose ($p < 0,036$), inflamação Acinar ($p < 0,047$) e inflamação portal ($p < 0,054$). Tumefação celular apresentou diferença significativa com predominância no animal sentinela ($p < 0,011$).

Quando analisado cada primata infectado pertencente à cinética da infecção secundária, levando em consideração a média da somatória dos escores de todos os parâmetros avaliados, foram observadas diferenças estatísticas significantes com predominância nos animais do 1º, 2º, 3º, 4º, 6º e 7º dpi, quando comparados ao

animal sentinela. Foram observadas diferenças estatísticas significantes com predominância no animal sentinela, quando comparada aos animais do 5^o, 15^o, 20^o, 30^o e 60^o dpi. Não houve diferença estatística significativa no animal do 45^o dpi (figura 15).

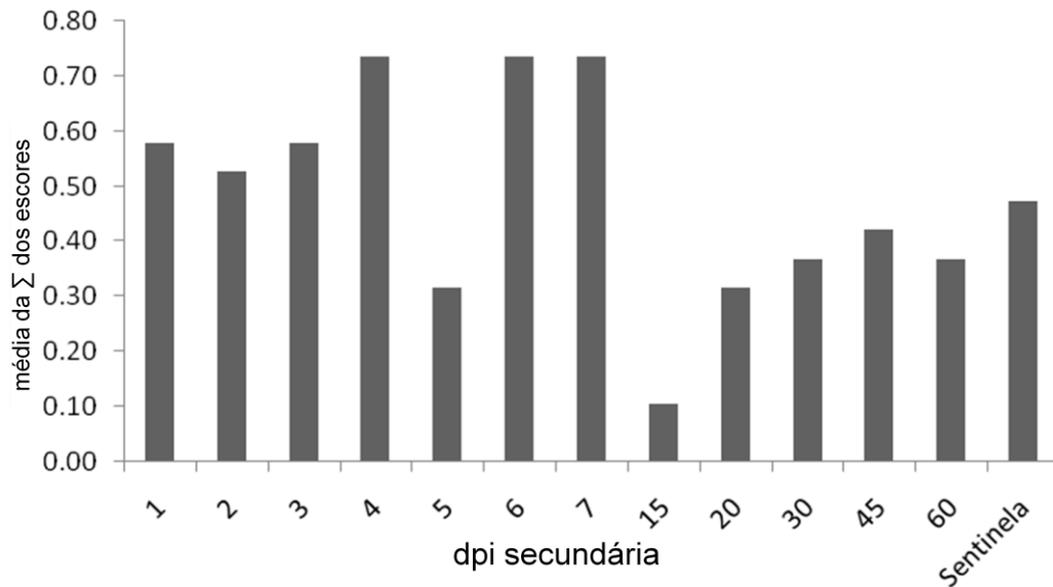


Figura 15: Semiquantificação das alterações no fígado de PNH durante a cinética da infecção secundária.

Legenda: 0.00 a 0.80 = média da somatória do escores de todos os parâmetros avaliados durante análise histopatológica; dpi secundária = dia pós-inoculação secundária.

3.2.2.3 Comparações entre a Infecções Primária e Secundária

A análise estatística mostrou diferença significativa com prevalência da Ag. 1 quando comparada com a Ag. 2 para apoptose ($p < 0,001$) e inflamação centrolobular ($p < 0,015$). Entre a Conv. 1 e a Conv. 2 não houve diferença estatisticamente significativa (parâmetros avaliados $p > 0,005$).

Dos parâmetros avaliados, quando comparamos infecção primária com a infecção secundária, sem dividir por fases das infecções, foi observada diferença significativa com prevalência na infecção primária para apoptose ($p < 0,007$), inflamação centrolobular ($p < 0,050$), Hemossiderina em K upffer ($p < 0,027$) e Hiperplasia/hipertrofia de K upffer ($p < 0,047$).

Para avaliar a intensidade da lesão hepática em cada fase da infec o primária e secundária foi realizada a média da somatória dos escores de todos os parâmetros avaliados. Através da análise estatística foi observada diferença significativa da Ag.1 quando comparada com Conv.1 e da Ag.2 quando comparada

com Conv.2. Não houve diferença significativa entre Ag.1 quando comparada com Ag.2, bem como, Conv.1 quando comparada com Conv.2 (figura 16).

A análise estatística da somatória dos parâmetros morte celular (apoptose e necrose de hepatócitos), inflamação (acinar, EP e VHC) e tumefação celular, apresentaram diferença significativa entre Ag.1 quando comparada com Conv.1 e Ag.2. Nas demais comparações entre as fases da infecção primária e secundária não foi observada diferença estatística significativa. Diferença estatística significativa foi observada entre Ag.1 e Ag.2 quando comparadas aos respectivos animais sentinelas, essa diferença significativa não foi observada entre as Conv.1 e Conv.2 e os animais sentinelas (figura 17).

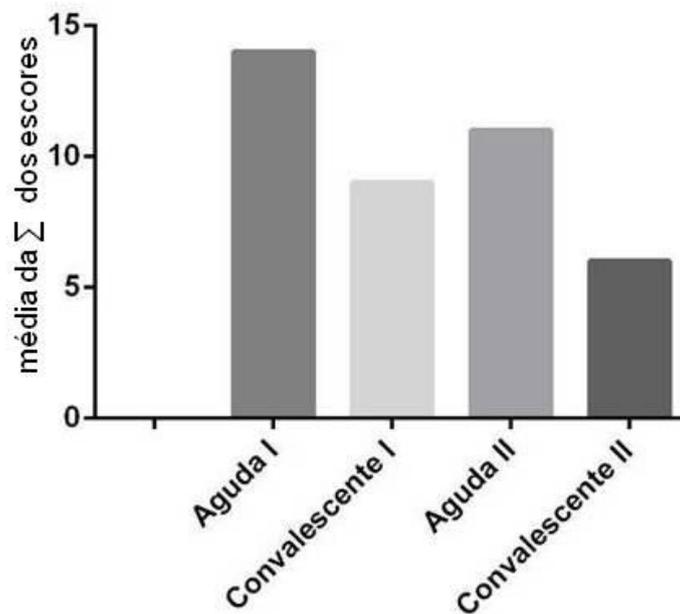


Figura 16: Semiquantificação da lesão hepática durante as fases da infecção primária e infecção secundária. Legenda: 0 a 15 = média da somatória do escores de todos os parâmetros avaliados durante análise histopatológica. Aguda I = fase aguda da infecção primária; Convalescente I = fase convalescente da infecção primária; Aguda II = fase aguda da infecção secundária; Convalescente II = fase convalescente da infecção secundária.

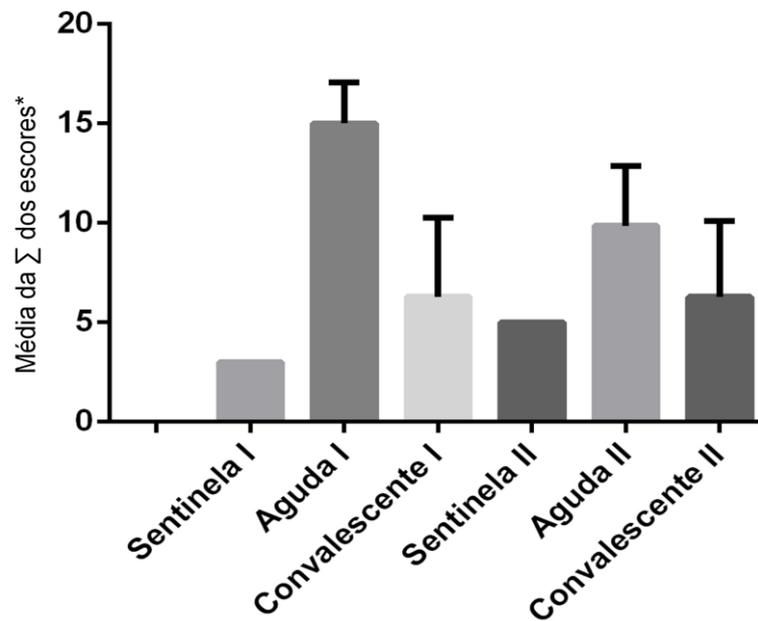


Figura 17: Caracterização de hepatite nas fases da infecção primária e infecção secundária. Legenda: 0 a 20 = média da somatória dos escores de alguns parâmetros avaliados durante análise histopatológica (apoptose, necrose, inflamação acinar, inflamação EP, inflamação VHC e tumefação celular. Sentinela I = animal sentinela da infecção primária; Aguda I = fase aguda da infecção primária; Convalescente I = fase convalescente da infecção primária; Sentinela II = animal sentinela da infecção secundária; Aguda II = fase aguda da infecção secundária; Convalescente II = fase convalescente da infecção secundária. *escores específicos (quadro 3).

3.3 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE

Os resultados das médias e desvio padrão das células imunomarcadas no ácido, EP e VHC com os anticorpos pré-estabelecidos encontram-se nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Avaliação Imuno-histoquímica - média e desvio padrão do Número de Células Positivas/mm² no ácido por grupos.

Anticorpos	Sentinela I	Ag.I	Conv.I	Sentinela II	Ag.II	Conv.II
VCAM	114.25	133.36	163.64	15.11	103.23	97.58
	±37.87	±199.92	±234.99	±10.09	±146.17	±116.90
S100	28.45	60.61	58.85	38.52	56.26	76.35
	±16.29	±88.84	±19.92	±16.80	±36.12	±36.15
Anticorpos	Sentinela I	Ag.I	Conv.I	Sentinela II	Ag.II	Conv.II
IL-10	9.78	46.08	21.06	9.33	22.26	17.33
	±3.08	±36.81	±16.44	±8.37	±12.30	±9.82
TGF-β	9.48	93.63	13.83	30.81	28.56	52.39
	±5.43	±94.12	±10.34	±3.70	±28.53	±27.24
CD95	0.00	336.34	2.54	0.00	1.54	0.24
	±0.00	±80.17	±2.90	±0.00	±2.84	±0.63
CD4	0.00	2.54	0.85	0.00	0.83	0.12
	±0.00	±2.95	±1.33	±0.00	±2.31	±0.46
TNF-α	13.04	135.18	137.33	116.98	164.03	205.58
	±2.72	±114.24	±75.19	±25.65	±194.11	±120.36
IFN-γ	5.93	41.20	47.58	33.93	38.68	48.31
	±6.24	±17.39	±43.27	±12.06	±25.40	±28.74
NK	0.59	9.80	4.20	0.89	4.78	1.69
	±1.03	±10.66	±3.88	±1.54	±5.45	±2.10
IL-8	3.85	3.14	3.96	0.00	1.07	0.89
	±4.01	±4.82	±5.40	±0.00	±1.43	±1.54
CD20	9.93 ±2.53	43.26	22.60	20.44	39.22	27.93
		±25.99	±10.62	±3.20	±30.86	±10.40
Lisozima	180.80	336.34	426.13	337.28	283.22	514.92
	±99.45	±80.17	±108.08	±90.85	±144.75	±113.55

Tabela 2 - Avaliação Imuno-histoquímica - média e desvio padrão do número de células positivas/mm² no espaço porta por grupos

Anticorpos	Sentinela I	Ag.I	Conv.I	Sentinela II	Ag.II	Conv.II
VCAM	10.20 ± 1.30	6.69 ± 2.79	6.20 ± 2.54	11.60 ± 2.41	8.23 ± 3.00	11.16 ± 3.76
S100	0.00 ± 0.00	2.26 ± 3.80	2.80 ± 3.75	1.40 ± 0.89	3.29 ± 5.25	3.00 ± 2.10
IL-10	0.40 ± 0.89	0.49 ± 0.65	2.52 ± 1.86	0.60 ± 0.89	1.89 ± 1.29	0.80 ± 0.65
TGF-β	4.80 ± 2.05	9.20 ± 8.67	7.00 ± 3.12	0.00 ± 0.00	3.66 ± 3.88	3.00 ± 3.59
CD95	0.00 ± 0.00	0.74 ± 1.39	0.36 ± 0.61	0.00 ± 0.00	0.63 ± 0.45	0.08 ± 0.18
CD4	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.38	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Anticorpos	Sentinela I	Ag.I	Conv.I	Sentinela II	Ag.II	Conv.II
TNF-α	1.20 ± 1.30	1.26 ± 0.93	1.80 ± 1.10	1.00 ± 1.00	1.17 ± 0.77	2.24 ± 2.04
IFN-γ	0.00 ± 0.00	0.94 ± 0.89	1.24 ± 2.23	0.00 ± 0.00	0.37 ± 0.59	0.00 ± 0.00
NK	6.80 ± 3.70	11.03 ± 7.43	5.36 ± 5.65	8.00 ± 5.96	4.63 ± 3.20	8.24 ± 2.17
IL-8	3.40 ± 1.52	0.40 ± 0.58	0.48 ± 0.67	0.00 ± 0.00	1.00 ± 2.56	0.00 ± 0.00
CD20	3.40 ± 1.52	14.71 ± 11.89	9.08 ± 7.65	4.40 ± 8.73	17.89 ± 28.63	7.56 ± 4.38
Lisozima	10.00 ± 10.10	12.59 ± 5.99	13.60 ± 12.29	7.60 ± 6.23	22.69 ± 21.84	15.20 ± 4.85

Tabela 3 - Avaliação Imuno-histoquímica - média e desvio padrão do número de células positivas/mm² na veia hepática central por grupos

Anticorpos	Sentinela I	Ag.I	Conv.I	Sentinela II	Ag.II	Conv.II
VCAM	0.00 ± 0.00	1.17 ± 1.57	0.16 ± 0.22	0.00 ± 0.00	0.97 ± 2.57	0.00 ± 0.00
S100	0.00 ± 0.00	0.43 ± 0.97	0.20 ± 0.28	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.38	0.00 ± 0.00
IL-10	0.00 ± 0.00	0.54 ± 0.54	0.56 ± 1.25	0.00 ± 0.00	0.37 ± 0.58	0.00 ± 0.00
TGF-β	5.80 ± 3.70	3.51 ± 3.08	2.76 ± 3.78	0.00 ± 0.00	0.37 ± 0.98	0.36 ± 0.80
CD95	0.00 ± 0.00	0.23 ± 0.29	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.38	0.00 ± 0.00
CD4	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TNF-α	0.00 ± 0.00	0.29 ± 0.51	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.23	0.04 ± 0.09
IFN-γ	0.00 ± 0.00	0.40 ± 0.66	0.08 ± 0.18	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
NK	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
IL-8	0.00 ± 0.00	0.34 ± 0.34	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.29 ± 0.76	0.00 ± 0.00
CD20	0.00 ± 0.00	10.71 ± 14.15	6.20 ± 7.65	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.41	0.12 ± 0.27
Lisozima	0.00 ± 0.00	13.57 ± 10.02	6.48 ± 9.96	0.00 ± 0.00	9.26 ± 11.86	4.36 ± 9.75

3.3.1. Imunomarcção para macrófagos

Positividade para anticorpo anti-lisozima foi observada em células de Küpffer residentes nos ácinos, bem como, em macrófagos nos espaços-porta e VHC (Figura 18).

3.3.1.1. Imuno-expressão acinar

Através da análise estatística observou-se distribuição preferencialmente por Z2 na Ag.1 e por Z1 na Conv.2 ($p < 0,01$), não sendo observada preferência por nenhuma zona acinar nas demais fases ($p > 0,05$).

A frequência de células marcadas com anti-lisozima na infecção secundária foi predominante quando comparada com a infecção primária ($p < 0,01$). Nas comparações entre as fases das infecções foi observada prevalência de células imunomarcadas na Conv. 2 quando comparada com a Ag.2 e Conv.1 ($p < 0,01$), bem como, prevalência na Ag.2 quando comparada com a Ag.1 ($p < 0,01$); entre Ag.1 e Conv.1 não foi observada diferença estatística significativa (figura 19).

Células imunomarcadas para lisozima foram mais prevalentes nos grupos Ag.1 e Conv.1; e Ag.2 e Conv.2 quando comparados aos respectivos sentinelas ($p < 0,01$) (figura 19).

Ao comparar o animal sentinela com cada primata infectado, foi observada prevalência de células imunomarcadas com anti-lisozima em todos os primatas infectados pertencentes à cinética da infecção primária em relação ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$), exceto do primata analisado no 1º dpi. O pico de expressão, estatisticamente significativa, para o fenótipo proteína lisozima foi observado nos primatas do 2º, 5º, 15º e 60º dpi primária quando comparados aos demais PNH infectados.

Na cinética da infecção secundária, os primatas do 4º, 5º, 6º, 7º, 30º 45º e 60º dpi apresentaram prevalência de marcação para lisozima quando comparados ao animal sentinela 2 ($p < 0,01$), tendo o pico de expressão, estatisticamente significativa, no 60º dpi.

3.3.1.2. Imuno-expressão nos EP

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de lisozima nos EP.

3.3.1.3. Imuno-expressão nas VHC

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de lisozima nas VHC.

3.3.2. Imunomarcção para células Matadoras Naturais (NK)

As células NK, marcadas por anticorpo anti-CD57, foram encontradas nos ácinos, nos EP e VHC (figura 18).

3.3.2.1 Imuno-expressão acinar

Observou-se distribuição predominante em Z1 durante a infecção primária e secundária ($p < 0,01$).

A frequência das células NK na infecção primária foi significativamente maior que na infecção secundária ($p < 0,01$). Na comparação entre as fases foi observada prevalência de células imunomarcadas na Ag.1 quando comparada com a Conv.1 e Ag.2 ($p < 0,01$), não sendo observada diferença significativa na comparação entre as demais fases (figura 19).

Células Nk foram mais frequentes nos grupos Ag.1 e Conv.1 quando comparados ao sentinela 1 ($p < 0,01$). Os grupos Ag. 2 e Conv.2 quando comparados ao sentinela 2 não apresentaram diferença estatística significativa (figura 19).

Ao comparar o animal sentinela com cada primata infectado, foi observada prevalência significativa de células NK nos fígados dos primatas do 3^o, 4^o, 5^o e 15^o dpi primária em relação ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$), apresentando pico de expressão, estatisticamente significativa, dessas células nos primatas do 3^o e 4^o dpi quando comparados aos demais primatas infectados .

A comparação na expressão de células NK entre cada primata pertencente à cinética da infecção secundária com o animal sentinela 2 não apresentou diferença estatística significativa.

3.3.2.2 Imuno-expressão nos EP

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de células NK nos EP.

3.3.2.3. Imuno-expressão nas VHC

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de células NK nas VHC.

3.3.3 Imunomarcção para células Apresentadoras de Antígenos (APC)

As células marcadas com anticorpo anti-S100 foram observadas nos ácinos, nos EP e VHC, principalmente em neutrófilos (figura 18).

3.3.3.1 Imuno-expressão acinar

Não foi observada predileção por nenhuma zona acinar durante as infecções primária e secundária ($p > 0,05$).

Não houve diferença estatística significativa na frequência de células proteína S100+ entre as infecções primária e secundária, porém, quando comparadas as fases das infecções observou-se prevalência de células imunomarcadas na Ag.1 quando comparada com a Conv.1 e Ag.2 ($p < 0,05$), bem como, prevalência na Conv.2 quando comparada com Ag.2 e Conv.1 ($p < 0,05$) (figura 19).

Células APC foram mais prevalentes nos grupos Ag.1 e Conv.1; e Ag.2 e Conv.2 quando comparados aos respectivos sentinelas ($p < 0,05$) (figura 19).

Ao comparar o animal sentinela com cada primata infectado, foi observada maior prevalência de células APC nos fígados dos primatas do 7^o e 30^o dpi primária em relação ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$); esses primatas apresentaram o pico de expressão para essas células, estatisticamente significativo, quando comparados aos demais primatas pertencentes à infecção primária.

A comparação entre cada primata infectado durante a cinética da infecção secundária com o animal sentinela 2 não apresentou diferença estatística significativa no tocante à expressão células apresentadoras de antígenos..

3.3.3.2 Imuno-expressão nos EP

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de APC nos EP.

3.3.3.3 Imuno-expressão nas VHC

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de APC nas VHC.

3.3.4 Imunomarcção para linfócitos T auxiliares (CD4+)

Os Linfócitos T CD4+ foram encontrados nos ácinos, nos EP e VHC (figura 18).

3.3.4.1 Imuno-expressão acinar

Não foi observada diferença na prevalência de imunomarcção por anti-LT-CD4 em nenhuma zona acinar durante as infecções primária e secundária ($p > 0,05$).

A frequência de Linfócitos T CD4+ na infecção primária foi significativamente maior que na infecção secundária ($p < 0,01$). Na comparação entre as fases foi observada prevalência de células imunomarcadas na Ag.1 quando comparada com a Conv.1 e Ag.2 ($p < 0,01$), não sendo observada diferença estatística significativa na comparação entre as demais fases (figura 19).

Linfócitos T CD4+ foram mais frequentes no grupo Ag.1 quando comparado ao sentinela 1 ($p < 0,01$) (figura 19). As demais comparações entre os grupos e o respectivo animal sentinela não apresentaram diferença estatística significativa (figura 15).

Foi observada prevalência de células imunomarcadas com anti-LT-CD4 nos fígados dos primatas coletados no 2º dpi primária e secundária quando comparados com seu respectivo sentinela ($p < 0,01$). Os demais animais não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao animal sentinela.

O pico de expressão, estatisticamente significativa, dessas células também foi do primata do 2º dpi primária e secundária, quando comparados aos demais PNH infectados.

3.3.4.2 Imuno-expressão nos EP

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de linfócitos T CD4 nos EP.

3.3.4.3 Imuno-expressão nas VHC

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de linfócitos T CD4 nas VHC.

3.3.5 Imunomarcção para Linfócitos B (CD20)

Células imunomarcadas (Linfócitos B - LB) com anticorpos anti-CD20 foram observadas nos ácinos, nos espaço porta e VHC, por vezes, sendo observadas ao redor de áreas com necrose lítica de hepatócitos (figura 18).

3.3.5.1 Imuno-expressão acinar

Não foi observado preferência de imunomarcção por alguma zona acinar durante as infecções primária e secundária ($p > 0,05$).

A frequência de linfócitos B na infecção primária foi significativamente maior que na infecção secundária ($p < 0,01$). Na comparação entre as fases foi observada maior prevalência de células imunomarcadas na Ag.1 quando comparada com a Ag.2 ($p < 0,01$), não sendo observada diferença estatística significativa na comparação entre as demais fases (figura 19).

Linfócitos B foram mais prevalentes nos grupos Ag.1 e Conv.1, bem como, Ag.2 e Conv.2 quando comparados aos respectivos sentinelas ($p < 0,01$) (figura 19).

Comparando o animal sentinela com cada primata infectado, foi observada prevalência de células imunomarcadas com anti-CD20 nos fígados dos primatas do 1º, 5º, 7º, 15º, 20º e 60º dpi primária em relação ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$). O Pico de expressão, estatisticamente significativo, para o LB-CD20+ foi observado nos primatas no 1º, 5º e 15º dpi primária, quando comparados aos demais PNH infectados.

Os primatas do 2º e 15º dpi secundária apresentaram frequência significativamente maior de linfócitos B quando comparados ao animal sentinela 2 ($p < 0,01$), esses primatas apresentaram o pico de expressão, estatisticamente significativo, para LB-CD20+ quando comparados aos demais PNH infectados.

3.3.5.2 Imuno-expressão nos EP

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de linfócitos B nos EP.

3.3.5.3 Imuno-expressão nas VHC

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de linfócitos B nas VHC.

3.3.6 Imunomarcção para Fas/APO-1 (CD95)

As células marcadas com anticorpo anti-CD95 foram observadas nos ácinos, nos EP e VHC (Figura 18), principalmente em hepatócitos e em algumas células infamatórias mononucleadas.

3.3.6.1 Imuno-expressão acinar

Não foi observada prevalência significativa de células CD95+ em nenhuma zona acinar durante as infecções primária e secundária ($p > 0,05$), entretanto, ao comparar as zonas por fases da infecção, observou-se distribuição predominante dessas células em Z2 na Ag.1 ($p < 0,01$); nas demais comparações por fases das infecções primária ou secundária não foram observadas diferenças estatísticas significantes.

Não houve diferença estatística significativa na frequência de células CD95+ entre as infecções primária e secundária, bem como, entre as fases das infecções (figura 19).

A expressão da proteína Fas foi prevalente nos grupos Ag.1 e Ag.2 quando comparada aos respectivos sentinelas ($p < 0,01$); nos demais grupos quando comparados aos respectivos animais sentinelas não foi observada diferença estatística significativa (figura 19).

Ao comparar o animal sentinela com cada primata infectado, não foi observada prevalência estatística significativa na expressão de células CD95+ nos fígados dos primatas pertencentes à infecção primária em relação ao animal sentinela 1, entretanto, foi observada diferença significativa nos primatas do 1^o, 2^o, e 4^o dpi secundária quando comparada ao animal sentinela 2 ($p < 0,01$), tendo o pico de expressão, estatisticamente significativa, no 2^o dpi quando comparados aos demais PNH infectados.

3.3.6.2 Imuno-expressão nos EP

Não foi observada diferença estatística significativa de células CD95+ entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de Fas nos EP.

3.3.6.3 Imuno-expressão nas VHC

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de Fas (células CD95+) nas VHC.

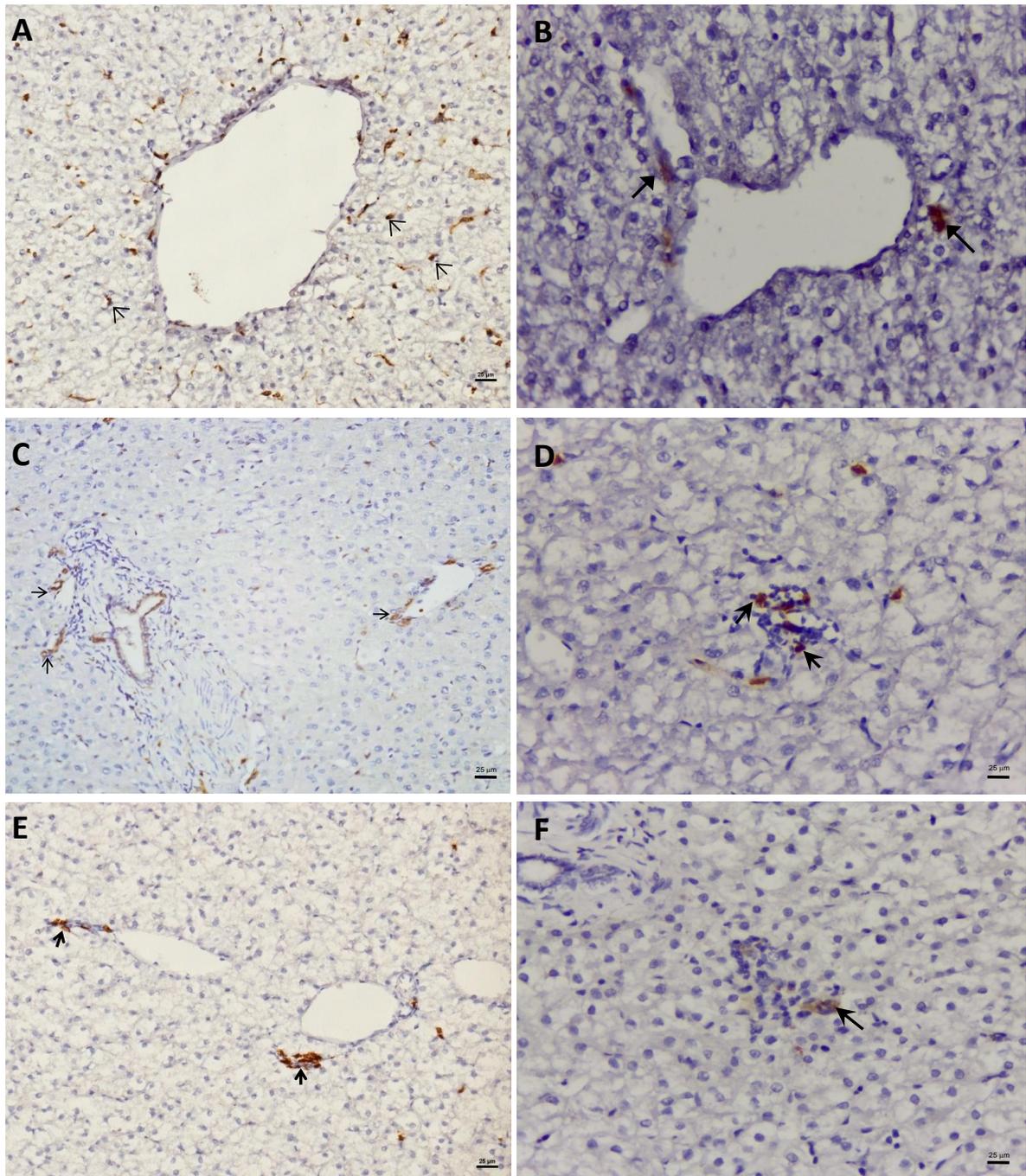


Figura 18: Fotomicrografia do fígado de PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados com VDEN. **A.** Imunomarcção para lisozima (seta), 4 dpi secundária, IHQ, 200x; **B.** Imunomarcção para células NK (seta), 5 dpi primária, IHQ, 400x; **C.** Imunomarcção para células apresentadoras de antígenos, proteína S100+ (seta), 3 dpi primária, IHQ, 200x; **D.** Imunomarcção para linfócitos T-CD4+ (seta), 4 dpi primária, IHQ, 400x; **E.** Imunomarcção para linfócitos B-CD20+ (seta), 7 dpi primária, IHQ, 200x; **F.** Imunomarcção para proteína Fas-CD95+ (seta), 1 dpi primária, IHQ, 400x.

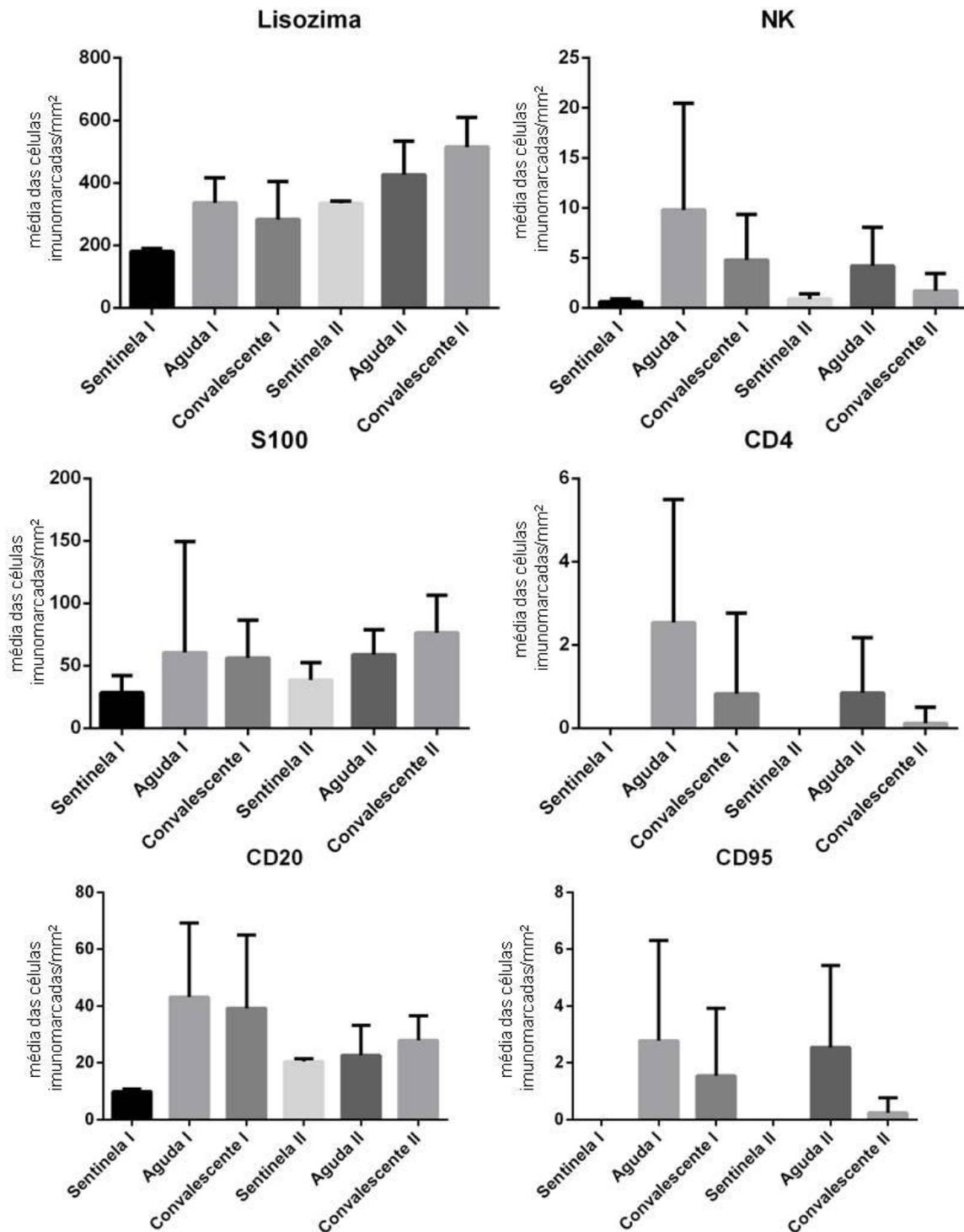


Figura 19: Imuno-expressão acinar de Lisozima, NK, S100, CD4, CD20 e CD95 por fases da infecção primária, secundária e animais sentinelas. Legenda: Sentinel I = animal sentinela da infecção primária; Aguda I = fase aguda da infecção primária; Convalescente I = fase convalescente da infecção primária; Sentinel II = animal sentinela da infecção secundária; Aguda II = fase aguda da infecção secundária; Convalescente II = fase convalescente da infecção secundária.

3.3.7 Imunomarcção para IFN- γ

A expressão de IFN- γ foi observada nos ácinos, nos EP e VHC (figura 20).

3.3.7.1 Imuno-expressão acinar

Através da análise estatística observou-se distribuição preferencialmente por Z1 e Z3 na Conv.1 ($p < 0,01$), bem como, por Z3 na Conv.2 ($p < 0,01$), não sendo observada preferência por nenhuma zona acinar nas demais fases da infecção ($p > 0,05$).

Não houve diferença estatística significativa na imuno-expressão de IFN- γ entre as infecções primária e secundária, bem como, entre as fases das infecções ($p > 0,05$) (figura 16).

A imunomarcção para IFN- γ foi mais frequente nos grupos Ag.1 e Conv.1 quando comparados ao sentinela 1 ($p < 0,01$) (figura 21). Os grupos Ag.2 e Conv.2 quando comparados ao sentinela 2 não apresentaram diferença estatística significativa (figura 21).

Ao comparar o animal sentinela com cada primata infectado, não foi observada prevalência estatística significativa de imunomarcção para IFN- γ apenas nos primatas do 3^o, 20^o e 30^o dpi primária em relação ao animal sentinela 1, em todos os outros primatas infectados pertencente à cinética da infecção primária foi observada diferença significativa ($p < 0,01$), tendo o pico de expressão, estatisticamente significativa, no 2^o, 5^o, 15^o e 45^o dpi primária quando comparados aos demais PNH infectados.

Na comparação entre cada primata infectado pertencente à cinética da infecção secundária com o animal sentinela 2, foi observada prevalência significativa nos primatas do 1^o, 6^o e 20^o dpi em relação ao animal sentinela 2 ($p < 0,01$); o pico de expressão, estatisticamente significativa, dessa citocina foi observada no 6^o dpi quando comparados aos demais PNH infectados .

3.3.7.2 Imuno-expressão nos EP

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de IFN- γ nos EP.

3.3.7.3 Imuno-expressão nas VHC

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de IFN- γ nas VHC.

3.3.8 Imunomarcção para TNF- α

A expressão de TNF- α foi observada nos ácinos, nos EP e VHC, com imuno-expressão em células de Küpffer e macrófagos (figura 20).

3.3.8.1 Imuno-expressão acinar

Não foi observada prevalência significativa de imunomarcção para TNF- α em nenhuma zona acinar durante a infecção primária e secundária, entretanto, ao comparar as zonas por fases das infecções, observou-se distribuição predominante dessa citocina em células de Z3 na Conv.1 ($p < 0,01$); nas demais comparações por fases da infecção primária ou secundária não foram observadas diferenças estatísticas significantes.

Não houve diferença estatística significativa na expressão de TNF- α entre as infecções primária e secundária. Ao comparar as fases das infecções foi observada maior prevalência de imuno-expressão na Conv.2 quando comparada com a Ag.2 ($p < 0,01$), embora, tenha sido observado esse mesmo padrão de prevalência entre Conv.1 e Ag.1, mas essa comparação não apresentou significância estatística, o que foi também observado, nas demais comparações entre as fases do experimento (figura 21).

A imuno-expressão de TNF- α foi mais frequente nos grupos Ag.1 e Conv.1 quando comparados ao sentinela 1, bem como, no grupo Conv.2 quando comparado ao sentinela 2, contudo, na Ag.2 não observou-se diferença estatística significativa, quando comparada ao animal sentinela 2 (figura 21).

Ao comparar o animal sentinela com cada primata infectado, foi observada prevalência de expressão de TNF- α nos fígados dos primatas do 1^o, 6^o, 7^o, 20^o, 30^o e 45^o dpi primária em relação ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$), tendo o pico de expressão, estatisticamente significativa, no 30^o dpi quando comparados aos demais PNH infectados.

Na comparação entre cada primata infectado pertencente à infecção secundária com o animal sentinela 2, foi observado frequência maior de imuno-

expressão de TNF- α nos fígados dos primatas do 1^o, 3^o, 6^o, 20^o, 30^o e 45^o ($p < 0,01$), apresentando pico de expressão, estatisticamente significativa, no 20^o dpi quando comparado aos demais PNH infectados.

3.3.8.2 Imuno-expressão nos EP

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de TNF- α nos EP nos diferentes tempos e fases do estudo.

3.3.8.3 Imuno-expressão nas VHC

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de TNF- α nas VHC nos diferentes tempos e fases do estudo.

3.3.9 Imunomarcção para IL-8

A imuno-expressão de IL-8 foi observada nos ácinos, nos EP e VHC (figura 20).

3.3.9.1 Imuno-expressão acinar

Não foi observada predileção por nenhuma zona acinar durante as infecções primária ou secundária ($p > 0,05$).

Não houve diferença estatística significativa na expressão de IL-8 entre as infecções primária e secundária. Ao comparar as fases das infecções foi observada maior prevalência de imuno-expressão na Ag.2 quando comparada com a Conv.2 ($p < 0,01$), embora, tenha sido observado esse mesmo padrão de prevalência entre Ag.1 e Conv.1, tal comparação não apresentou significância estatística, igualmente observado nas demais comparações entre as fases do estudo (figura 21).

A IL-8 foi menos expressa no grupo Conv.1 quando comparado ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$); e mais expressa no grupo Ag.2 quando comparado ao sentinela 2 ($p < 0,01$), contudo, na Ag.1 e na Conv.2 não observou-se diferença estatística significativa, quando comparadas aos respectivos animais sentinelas (figura 21).

Ao comparar o animal sentinela com cada primata infectado, não foi observada prevalência estatística significativa na expressão de IL-8 nos fígados dos primatas infectados pertencentes à infecção primária em relação ao animal sentinela 1, entretanto, foi observada diferença significativa nos primatas do 3º e 6º dpi secundária quando comparada ao animal sentinela 2 ($p < 0,01$), tendo o pico de expressão, estatisticamente significativa, no 6º dpi quando comparado aos demais PNH infectados.

3.3.9.2 Imuno-expressão nos EP

IL-8 foi menos expressa nos EP nos grupo Conv.1 quando comparado ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$). Nas demais comparações realizadas não se observaram diferenças estatísticas significantes.

3.3.9.3 Imuno-expressão nas VHC

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de IL-8 nas VHC.

3.3.10 Imunomarcção para TGF- β

A expressão de TGF- β foi observada nos ácinos, nos EP e VHC, com imuno-expressão em células de Küpffer e hepatócitos (figura 20).

3.3.10.1 Imuno-expressão acinar

Observou-se distribuição predominante em Z1 durante a infecção primária ($p < 0,01$), entretanto, não foi observada preferência dessa citocina por nenhuma zona acinar na infecção secundária ($p > 0,05$).

A frequência de expressão de TGF- β durante a infecção primária foi significativamente maior que na infecção secundária ($p < 0,01$). Na comparação entre as fases foi observada maior prevalência de expressão de TGF- β na Ag.1 quando comparada com a Conv.1 e Ag.2 ($p < 0,01$), bem como, na Conv.2 quando comparada com a Ag.2 ($p < 0,01$), não sendo observada diferença estatística significativa na comparação entre as demais fases (figura 21).

O TGF- β foi mais expresso no grupo Ag.1 quando comparado ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$), no entanto não observou-se diferença estatística significativa na expressão dessa citocina nos demais grupos experimentais, quando comparados com os respectivos animais sentinela (figura 21).

Ao comparar o animal sentinela com cada primata infectado, foi observada maior prevalência de expressão de TGF- β nos fígados dos primatas do 1^o, 2^o, 6^o, 7^o, 15^o e 60^o dpi primária em relação ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$), tendo sido o pico de expressão, estatisticamente significativo, no 7^o dpi quando comparados aos demais PNH infectados.

Na comparação entre cada primata infectado pertencente à infecção secundária com o animal sentinela 2, foi observado maior frequência de imuno-expressão de TGF- β nos fígados dos primatas do 15^o e 60^o ($p < 0,01$); esses primatas apresentaram pico de expressão dessa citocina, estatisticamente significativo, quando comparados aos demais primatas pertencentes à infecção secundária.

3.3.10.2 Imuno-expressão nos EP

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de TGF- β nos EP no experimento.

3.3.10.3 Imuno-expressão nas VHC

A expressão de TGF- β nas VHC foi mais frequente na Conv.1 quando comparada com a Conv.2 ($p < 0,01$); nas comparações entre as demais fases não foram observadas diferenças estatísticas significantes.

3.3.11 Imunomarcção para IL-10

A presença de células com expressão de IL-10 foi observada nos ácinos, nos EP e VHC (figura 20).

3.3.11.1 Imuno-expressão acinar

Não foi observada prevalência significativa de imunomarcção para IL-10 em nenhuma zona acinar durante as infecções primária e secundária, entretanto, ao comparar as zonas por fases das infecções, observou-se distribuição predominante dessa citocina em Z3 na Ag.1 ($p < 0,01$); nas demais comparações por fases das

infecções primária ou secundária não foram observadas diferenças estatísticas significantes.

A frequência de expressão de IL-10 em células na infecção primária foi significativamente maior que na infecção secundária ($p < 0,01$). Na comparação entre as fases foi observada prevalência de expressão na Ag.1 quando comparada com a Conv.1 e Ag.2 ($p < 0,01$); nas comparações entre as demais fases não foram observadas diferenças estatísticas significantes (figura 21).

A IL-10 foi mais expressa nos grupos Ag.1 e Conv.1 quando comparados ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$). Os grupos Ag.2 e Conv.2 quando comparados ao sentinela 2 não apresentaram diferença estatística significativa (figura 21).

Ao comparar o animal sentinela com cada primata infectado, foi observada maior prevalência de expressão de IL-10 nos fígados dos primatas do 1º, 2º, 6º, 7º e 45º dpi primária em relação ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$), tendo o pico de expressão, estatisticamente significativa, no 7º dpi quando comparados aos demais PNH infectados.

Na comparação entre cada primata infectado pertencente à infecção secundária com o animal sentinela 2, foi observado maior frequência de imuno-expressão de IL-10 nos fígados dos primatas do 7º e 30º ($p < 0,01$), tendo o pico de expressão, estatisticamente significativa, no 7º dpi quando comparados aos demais PNH infectados.

3.3.11.2 Imuno-expressão nos EP

Não foi observada diferença estatística significativa durante o experimento, entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de IL-10 nos EP.

3.3.11.3 Imuno-expressão nas VHC

A expressão de IL-10 nas VHC foi mais frequente na Conv.1 quando comparada com a Ag.1 ($p < 0,01$), bem como, na Ag.2 quando comparada com Conv.2 e Ag.1 ($p < 0,01$). Ao comparar Conv.1 com Conv.2 não foi observada diferença estatística significativa.

IL-10 foi mais expressa nas VHC nos grupos Conv.1 e Ag.2 quando comparados aos respectivos animais sentinelas ($p < 0,01$). Os demais grupos quando

comparados aos respectivos animais sentinelas não apresentaram diferença estatística significativa.

3.3.12 Imunomarcção para molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM).

A expressão de VCAM foi observada nos ácinos, nos EP e VHC, com imuno expressão nos sinusóides (figura 20).

3.3.12.1 Imuno-expressão acinar

Não foi observada predileção de VCAM por nenhuma zona acinar durante as infecções primária e secundária ($p > 0,05$).

Não houve diferença estatística significativa na expressão de VCAM entre as infecções primária e secundária, bem como, entre as fases das infecções (figura 21).

A proteína (molécula) VCAM foi mais expressa no grupo Ag.2 quando comparados ao animal sentinela 2 ($p < 0,01$) (figura 16). Os demais grupos quando comparados aos respectivos sentinelas não apresentaram diferenças estatísticas significantes (figura 21).

Ao comparar o animal sentinela com cada primata infectado, foi observada maior prevalência de expressão de VCAM em todos os primatas infectados pertencente à cinética da infecção primária em relação ao animal sentinela 1 ($p < 0,01$), exceto dos primatas analisados no 2º e 45º dpi. O Pico de expressão, estatisticamente significativo, para VCAM foi observado nos primatas no 1º, 7º e 60º dpi primária, quando comparados aos demais PNH infectados.

Os primatas do 5º, 7º, 20º e 45º dpi secundária apresentaram expressão significativamente maior de VCAM quando comparados ao animal sentinela 2 ($p < 0,01$), esses primatas apresentaram o pico de expressão, estatisticamente significativo, para VCAM quando comparados aos demais PNH infectados.

3.3.12.2 Imuno-expressão nos EP

A expressão de VCAM nos EP foi mais frequente na Conv.2 quando comparada com a Conv.1 ($p < 0,01$), na comparação entre as demais fases não foram observadas diferenças estatísticas significantes.

VCAM foi menos expressa nos EP nos grupos Ag.1, Conv.1 e Ag.2 quando comparados aos respectivos animais sentinelas ($p < 0,01$), contudo, na Conv.2 não observou-se diferença estatística significativa, quando comparada ao animal sentinela 2.

3.3.12.3 Imuno-expressão nas VHC

Não foi observada diferença estatística significativa entre as comparações realizadas com resultados obtidos da expressão de VCAM nas VHC durante todo o estudo.

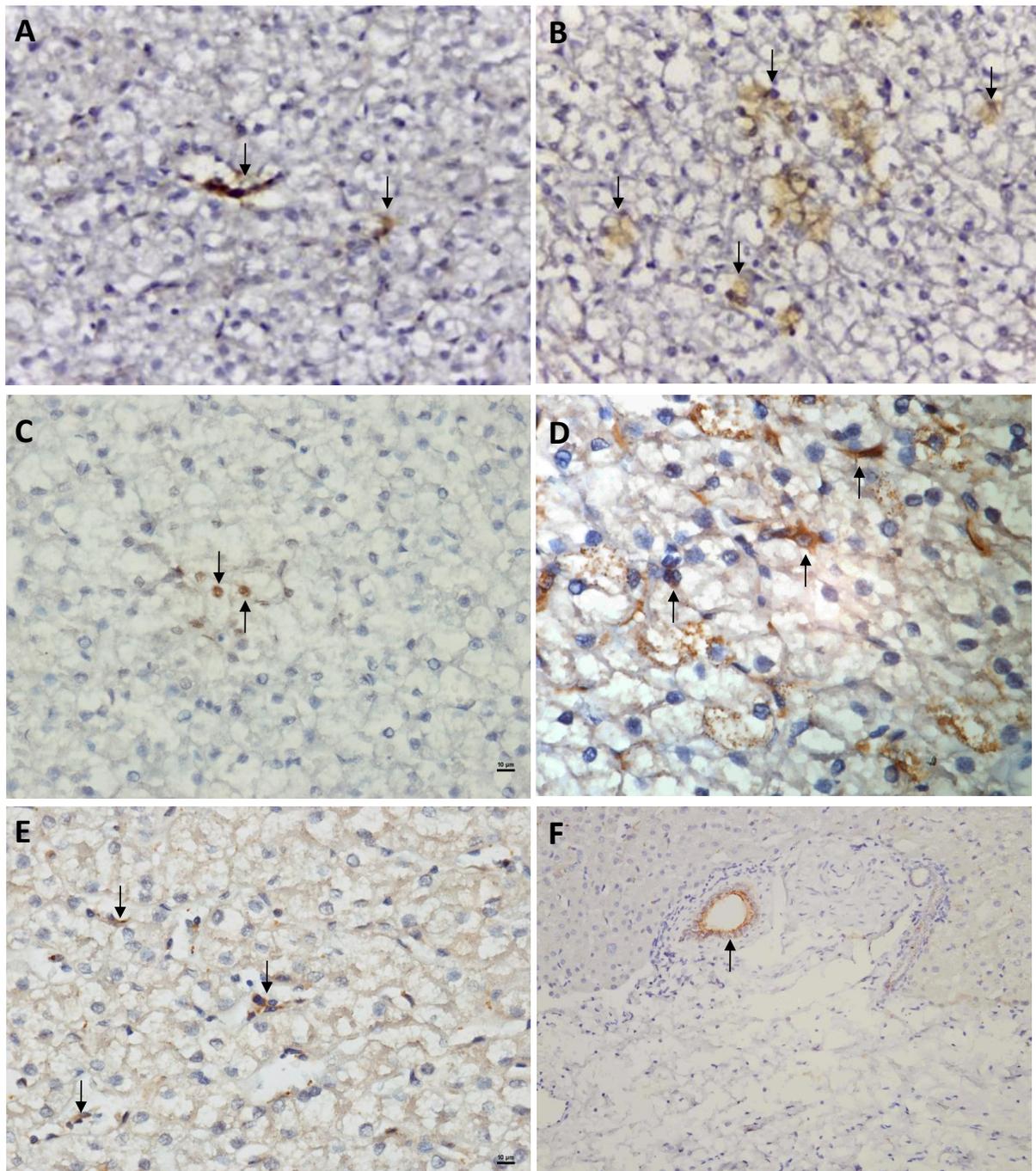


Figura 20: Fotomicrografia do fígado de PNH da espécie *Callithrix penicillata* infectados com VDEN. **A.** Imuno-expressão de IFN- γ (seta), 15 dpi primária, IHQ, 400x; **B.** Imuno-expressão de TNF- α (seta), 7 dpi primária, IHQ, 400x; **C.** Imuno-expressão de IL-8 (seta), 45 dpi primária, IHQ, 400x; **D.** Imuno-expressão de TGF- β (seta), 7 dpi secundária, IHQ, 400x; **E.** Imuno-expressão de IL-10 (seta), 1 dpi primária, IHQ, 400x; **F.** Imuno-expressão de VCAM (seta), 3 dpi primária, IHQ, 200x.

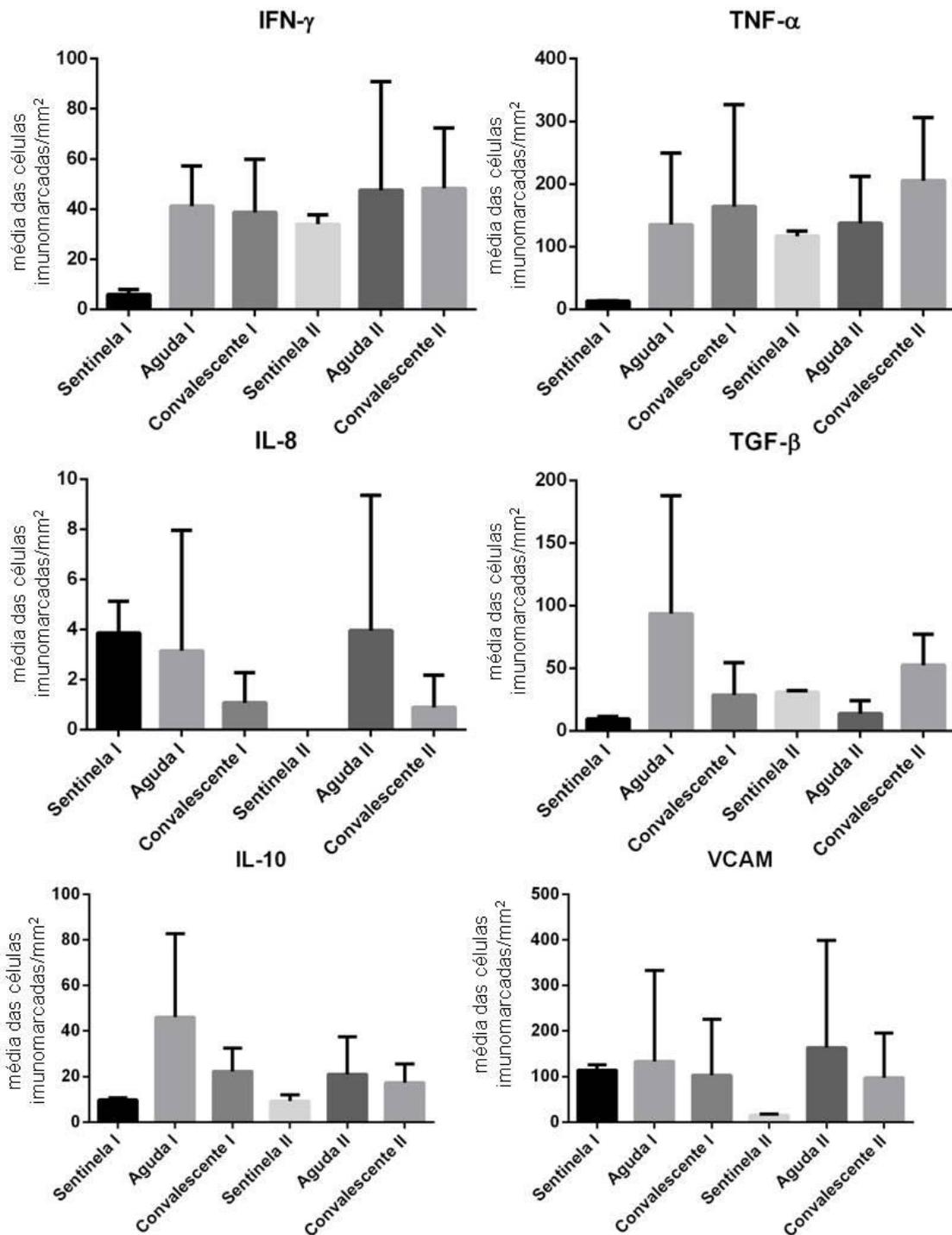


Figura 21: Imuno-expressão acinar de IFN- γ , TNF- α , IL-8, TGF- β , IL-10 e VCAM por fases da infecção primária, secundária e animais sentinelas. Legenda: Sentinel I = animal sentinela da infecção primária; Aguda I = fase aguda da infecção primária; Convalescente I = fase convalescente da infecção primária; Sentinel II = animal sentinela da infecção secundária; Aguda II = fase aguda da infecção secundária; Convalescente II = fase convalescente da infecção secundária.

4 DISCUSSÃO

Considerações sobre o modelo selecionado, desenho estabelecido para cinética experimental e suscetibilidade à replicação sequencial do VDEN no fígado de PNH da espécie *Callithrix penicillata*

Os PNH do gênero *Callithrix* têm sido utilizados frequentemente como modelo animal em pesquisas com doenças infecciosas virais, doenças parasitárias, estudos em neurociências, em toxicologia e desenvolvimento de drogas farmacêuticas (Mansfield, 2003; Pissinatti, 1993), essa crescente utilização está relacionada ao tamanho dos animais, ao custo baixo de aquisição e manutenção, à sua fácil e eficiente reprodução, além das particularidades fisiológicas e da biologia desses pequenos primatas (Pissinatti, 1993). A necessidade de um modelo experimental que possibilite dados sobre a patogenia e fisiopatologia da dengue e dengue grave associado ao caso do PNH (*Callithrix jacchus*) diagnosticado com FHD (Barros, 2009) e aos casos de isolamento do VDEN em PNH (IEC/SAARB, 2014; dados não publicados), demonstram a importância de estudos experimentais com infecção pelo VDEN em primatas deste gênero, visando o uso desses animais na avaliação de possíveis vacinas para dengue.

A detecção de antígenos virais demonstraram que esses animais são susceptíveis à replicação sequencial pelo VDEN-3 e VDEN-2, sendo observado no fígado de todos os primatas infectados com VDEN, com exceção do fígado coletado no 20^o dpi secundária, entretanto, esse animal apresentou no soro anticorpos IgM anti-VDEN-2, bem como, anticorpos IH anti-VDEN-2 (Ferreira, 2012). Nossos resultados corroboram os encontrados por Moi *et al.* (2014), que confirmaram susceptibilidade através da detecção de RNA do VDEN em amostras de plasmas de primatas, espécie *Callithrix jacchus*, infectados experimentalmente com a mesma sequência de VDEN; em outro experimento Omatsu *et al.* (2011) detectaram RNA do VDEN em fígados de *Callithrix jacchus* coletados nos dias 5, 8 e 14 dias pós-infecção primária com VDEN-2, e observaram presença de antígenos virais, por imunohistoquímica, em células de Küpffer.

Em casos fatais de humanos com dengue grave antígenos virais têm sido detectados em hepatócitos e células de Küpffer (Fresh at al. 1969; Rosen at al. 1989; Innis, 1995; Bhamarapravati et al., 1997; Couverland at al. 1999; Oliveira at al. 2005), em nosso estudo também observamos presença de antígenos virais nos hepatócitos, células de Küpffer e corpúsculos de Councilman, assim como, em órgãos linfóides de todos os primatas infectados, corroborando com os achados de Omatsu *et al.* (2011) que também observaram em seu experimento com primatas, a detecção de antígenos do VDEN em órgãos linfóides. Os resultados obtidos com a detecção de antígenos apresentados neste estudo confirmam que a infecção sequencial pelo VDEN-3 e VDEN-2 foi estabelecida em *Callithrix penicillata* após infecção experimental, além de sugerir que ambos VDEN-2 e VDEN-3 se propagam em órgãos linfóides e não linfóides dessa espécie.

O favorecimento de um quadro de dengue grave pela infecção secundária heterotípica não foi observada em nosso experimento, no entanto raramente a dengue grave é observada em PNH durante o ciclo silvestre mantido no sudeste da Ásia e oeste da África, bem como na infecção pelo VDEN silvestre em humanos nessas regiões (Vasilakis *et al.*, 2011). No ciclo urbano é bem documentado que apenas uma pequena porcentagem de casos de dengue evolui para dengue grave, a maioria que decorrem de infecção secundária costumam ser assintomáticos ou manifestar-se como dengue (FD) (Rothman, 2011; Zompi at al., 2011).

Apesar destas constatações sugerimos que esse gênero, assim como essa espécie, é um bom modelo para avaliar dengue grave, pois tem sido relatado que a gravidade da doença está relacionado com altos níveis de viremia (Libraty 2002), sendo assim, já foi comprovada a capacidade dessa espécie em apresentar viremia alta para infecção primária com VDEN-3 (Ferreira *et al.*, 2014), no referido experimento foi utilizado o mesmo grupo de calitriquídeos que analisamos em nosso estudo, seguindo o mesmo desenho experimental da infecção primária e observamos que, os animais do 2^o até o 7^o dpi apresentaram carga viral por RT-qPCR, com pico relevante de viremia no 5^o dpi primária; Moi *et al.* (2014) também observaram em primatas da espécie *Callithrix jacchus* altos níveis de viremia após a infecção secundária com sorotipos heterólogos do VDEN.

O fato de não termos observado dengue grave nos primatas estudados, talvez esteja associado com o período de tempo transcorrido entre a infecção primária e a secundária (dois meses), embora, tenha sido descrito que em humanos

a infecção primária produz proteção temporária e parcial contra os outros três sorotipos, permitindo que após um curto período de tempo (cerca de seis meses) infecções secundárias ou sequenciais sejam possíveis (Kuno, *et al* 1987). Apesar dos nossos resultados comprovarem o estabelecimento da infecção secundária por diferente sorotipo do VDEN, o curto período entre as infecções pode ter sido influenciado pela presença de anticorpos neutralizantes ao sorotipo previamente infectado (VDEN-3) causando bloqueio (neutralização) do VDEN-2. Em estudo posterior ao nosso, Vasconcelos *et al.* (dados não publicados) observaram alterações histológicas mais extensas e graves nos rins e fígados de três primatas *Callithrix penicillata*, infectados primariamente pelo VDEN-2 que após um ano e oito meses foram reinfectedados com VDEN-3.

É importante ressaltar a utilização em nosso estudo de cepas não adaptadas para PNH e que foram isoladas de fragmentos de linfonodo e fígado de humanos diagnosticados com dengue grave fatal (FHD/SCD), demonstrando que esses isolados clínicos mesmo sem adaptação a esses animais, têm a capacidade de replicar *in vivo* nos PNH e induzir infecção. Os resultados obtidos com a utilização das cepas não adaptadas, contendo $3,23 \times 10^3$ PFU/mL de VDEN-3 e $4,47 \times 10^4$ de VDEN-2, consideradas doses relativamente baixas de inóculos virais, indicaram que os PNH da espécie *Callithrix penicillata* possuem alta sensibilidade aos sorotipos do VDEN. Omatsu *et al.* (2012) utilizando cepas adaptadas, com a mesma dosagem (10^4 e 10^3 de VDEN-2) e comparando com dosagens mais altas ($10^7 - 10^5$ de VDEN-2) observaram que não é necessária dose alta de inóculo infectante do VDEN para resultar em infecção e obter viremia com títulos elevados e de longa duração em primatas desse gênero.

Qual o padrão das alterações histopatológicas no fígado dos calitricídeos estudados?

Os dados da literatura que relatam lesões histológicas no fígado associadas ao VDEN, referem-se aos casos de dengue grave (FHV/SCD), até o momento não se tem referências de estudos histopatológicos no fígado durante a dengue clássica, assim como, estudos histopatológicos com primatas do Novo Mundo. É importante o conhecimento do espectro completo da doença para compreensão da patogênese

da dengue, desta forma, preenchendo várias lacunas que ainda existem. Os recentes achados de isolamento do VDEN em primatas em natureza (Barros, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2014, dados não publicados) e a constante discussão sobre a possibilidade de emergir um ciclo silvestre de dengue nas Américas a partir de um *spillback* de humanos, tal qual, sugerido por Teoh *et al.* (2010) com a cepa silvestre do VDEN-1 da Malásia, demonstram a importância de estudar o padrão das alterações observadas nesses animais quando infectados pelo VDEN.

Em nosso estudo foram observadas alterações histopatológicas nos fígados dos primatas da espécie *Callithrix penicillata* semelhantes aos observados na literatura obtidos de casos fatais por dengue grave (FHD/SDC) em humanos, porém com intensidade e amplitude diferentes. Identificamos a presença de apoptose, focos de necrose lítica, esteatose, tumefação celular, inflamação (acinar, EP e VHC), hiperplasia/hipertrofia em células de Küpffer, hemossiderina em células de Küpffer e dilatação dos sinusóides; esses achados corroboram com os descritos por Bhamararava *et al.* (1967) entre outros estudos, como o recente realizado por Aye *et al.* (2014) com fígados de 13 crianças que morreram de FHD/SDC em Myanmar; semelhante ao nosso estudo, eles também não observaram colestase e fibrose.

As análises estatísticas dos parâmetros histopatológicos demonstraram que os PNH infectados apresentaram padrão de morte celular dos hepatócitos por apoptose quando comparado com a necrose, nos primeiros sete dias da infecção primária, correspondendo à fase aguda da infecção. Nos outros dias analisados durante as infecções primária e secundária não foi observada essa diferença significativa entre os tipos de morte celular. Brasil, (2005) também observou essa participação maior da apoptose em relação à necrose como forma de morte dos hepatócitos em estudo hepático de 17 casos de óbitos por FHD.

Apoptose é considerada uma das principais alterações encontradas na dengue, assim como em outras infecções virais (Vasconcelos *et al.*, 2013; Quaresma *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 1983); em nosso estudo os hepatócitos apoptóticos foram morfológicamente visualizados por corpúsculos de Councilman, sendo caracterizados por células ovais ou redondas, por vezes reduzidas em tamanho, com citoplasma intensamente eosinofílico e núcleos picnóticos, outros corpúsculos mostraram-se desprovidos de núcleos, esses achados são similares aos obtidos por Courvelad *et al.* (1999) e Huerre *et al.* (2001) que observaram corpúsculos de Councilman em fígados de casos fatais por dengue. Para

demonstrar que os corpúsculos visualizados na dengue correspondiam a células apoptóticas, esses autores utilizaram a imunomarcagem tecidual pela técnica do TUNEL, sendo descrita a presença de hepatócitos em apoptose especialmente ao redor dos focos necróticos; essa preferência na localização das células apoptóticas circundando focos necróticos também foi observada em nosso estudo.

O encontro de corpúsculos de Councilman na fase aguda da infecção primária estão de acordo com os achados de Marianneau *et al.* (1998) que observaram células apoptóticas em culturas de células HepG2 24 hs após infecção pelo VDEN, aumentando com o tempo a porcentagem de células apoptóticas, sendo analisada até 72 hs após infecção; o fato de não termos observados o mesmo padrão na infecção secundária pode estar relacionado à rapidez que esses fragmentos são expulsos e fagocitados, podendo sob o aspecto histológico ser indetectável. De fato, e fortalecendo essa análise, observamos a prevalência da expressão da proteína Fas (CD95⁺) no grupo Ag.2 quando comparados com o animal sentinela 2.

Relacionando as pesquisas com TGF- β e TNF- α que relatam a atuação dessas citocinas como indutoras de apoptose (Bradham *et al.*, 1998; Attisano; Wrana, 2002) com nossos achados, observamos que as expressões de ambas prevalecem na fase aguda primária quando comparamos com o animal sentinela, que é a mesma fase da infecção experimental em que prevalece apoptose como morte celular, desta forma pode-se supor a influência dessas citocinas para destruição dos hepatócitos.

Em nossa casuística foram encontrados antígenos virais em corpúsculos de Councilman, a mesma observação foi descrita por Quaresma *et al.* (2007) em fígados de humanos com febre amarela; através de análise ultraestrutural em fígados de humanos com dengue Brasil (2005) observaram a presença de partículas virais associadas aos corpúsculos de Councilman, esses dados em conjunto sugerem que as lesões hepáticas são indicativas da própria lesão viral durante certas fases da doença.

Apenas a apoptose foi a forma de morte celular que prevaleceu estatisticamente em alguma fase da infecção, entretanto, discretos focos de necrose lítica com distribuição preferencialmente por Z2 foram observados em todas as fases das infecções primária e secundária; esses achados são similares com os observados em fígados de pacientes com FHD, porém a intensidade e extensão

menores (Bhamarapravati et al., 1967; Burke, 1968; Huerre *et al.* 2001; Torres, 2005).

Na dengue, provavelmente, a causa da necrose lítica é multifatorial, incapacitando a célula de manter a integridade da membrana e os seus conteúdos sempre extravasam. O choque hipovolêmico na dengue grave (FHD/SCD) determina situação de hipofluxo para o fígado que pode levar a alteração de permeabilidade da membrana mitocondrial resultando em falha na fosforilação oxidativa e depleção progressiva de ATP, culminando na necrose da célula, porém, nenhum PNH analisado em nosso estudo apresentou manifestações clínicas ou laboratoriais compatíveis aos observados na dengue grave (FHD/SCD) que demonstre perda de sangue ou plasma (Ferreira, 2012). Este fato sugere que a necrose lítica observada em nosso experimento esteja relacionada à interação vírus/célula, interferindo nas funções normais do hepatócito, fazendo com que a permeabilidade das membranas seja alterada, gerando extravasamento das enzimas dos lisossomos para o citoplasma, resultando na autólise da célula (Santos *et al.*, 2008).

Por outro lado, a participação de linfócitos T citotóxicos através do ataque a expressão de proteínas virais na superfície da célula, envolvendo liberação de perforinas, também pode estar relacionada à necrose lítica de hepatócitos em nosso estudo, haja vista que os focos necróticos estavam sempre associados à infiltração linfocítica, seguida pela presença de macrófagos e neutrófilos.

Esteatose é um dos achados histológicos frequentemente encontrados nos casos de dengue grave e possui localização predominante em Z2 (Bhamararava *et al.*, 1967; Courvelad *et al.*, 1999; Huerre *et al.*, 2001; Brasil, 2005), o desencadeamento da esteatose hepática tem sido associada com fatores do hospedeiro e a presença de infecção viral (Dev *et al.*, 2004; Castera *et al.*, 2005); em nosso estudo a esteatose apesar de pouco frequente manteve esse padrão com predominância em Z2, sendo discretamente observada em um animal por fase em cada infecção primária e secundária;

Ao relacionar a presença de antígenos virais com a esteatose hepática nesses animais, foi observado que tanto o primata do 3^o dpi primária quanto o primata do 60^o dpi primária apresentaram esteatose e muito intensa (4+ na escala de semi-quantificação de antígenos) marcação de antígenos do VDEN, os primatas do 2^o e 15^o dpi secundária apresentaram esteatose, bem como, moderada e leve (2+ e 1+ na escala de semi-quantificação de antígenos) marcação de antígenos do

VDEN respectivamente; a presença de antígenos do VDEN, assim como, esteatose foram predominantes em Z2, essas observações citadas sugerem que em nossa casuística a relação vírus/célula possa ter induzido um desequilíbrio da homeostase lipídica (Alberts et al., 2002). Ramalho (2003) também sugeriu relação entre o vírus da hepatite C com o desencadeamento de esteatose, demonstrando que em pacientes que eliminaram o vírus após terapêutica há desaparecimento da esteatose.

Discreta a intensa presença de hemossiderina foi observada em células de Küpffer e ocasionalmente em hepatócitos, Quaresma *et al.* (2003) também observaram presença discreta de hemossiderina em células de Küpffer de fígados de humanos infectados com febre amarela. Os excessos locais de hemossiderina resultam de hemorragia, entretanto, essa alteração não foi observada em nosso estudo; hemossiderose hepática é uma condição comumente encontrada em saguis e outros primatas do Novo Mundo, não tendo relevância patológica (Brack *et al.*, 1981; Chalifoux *et al.*, 1982; Charmers *et al.*, 1983; Tucker, 1984; Potkay *et al.*, 1992); alguns autores atribuem a hemossiderose nos saguis à hemólise acelerada (Brack *et al.*, 1981; Charmers *et al.*, 1983). Em outro estudo foi demonstrado que a alta concentração de ferro, tipicamente encontrada em dietas para macacos provenientes de colônias usadas exclusivamente para pesquisa, foi a causa da hemossiderose hepática em primatas da espécie *Callithrix jacchus* (Miller *et al.*, 1997), esse acúmulo notável de ferro não danifica as células parenquimatosas ou prejudicam a função do órgão (Kumar *et al.*, 2008).

Degeneração hidrópica caracterizada pela tumefação celular é uma lesão hepática frequente na dengue (Santos, 2008), em nosso estudo essa lesão foi prevalente em todas as fases durante as infecções primária e secundária, semelhantes aos achados de Barth *et al.* (2006) que observaram intensa tumefação de hepatócitos durante a fase aguda (2^o e 3^o dpi) e convalescente (13, 14, 17 e 49 dpi) da infecção pelo VDEN-2 em ratos adultos BALB/c. Aye *et al.* (2014) também observaram tumefação de hepatócitos em todos os 13 casos fatais por FHD que analisaram.

O animal sentinela 2 apresentou tumefação celular por todo o ácino, sendo observada prevalência dessa lesão quando comparados aos grupos Ag.2 e Conv.2, sabemos que nesse animal essa lesão não está associada à infecção pelo VDEN, haja vista, que ele não foi infectado durante a cinética experimental, sendo utilizado

com o objetivo de refletir qualquer perturbação do meio ambiente até o final do experimento. A degeneração hidrópica é considerada a lesão não-letal mais comum diante dos mais variados tipos de agressão, independentemente da natureza do agente agressor (Pereira, 2009), desta forma, a presença de tumefação celular no animal sentinela 2 pode ter sido provocada por uma grande variedade de agentes lesivos que conduzem a falência das bombas eletrolíticas na membrana plasmática, levando à entrada de água no citoplasma e à expansão isosmótica da célula.

O animal sentinela 2 apresentou perda de peso considerável durante a cinética experimental, seu peso pré-infecção era de 455 g e chegou a pesar durante o experimento 285 g, totalizando uma perda de até 170 g; a abrupta perda de peso pode estar relacionado ao afastamento do grupo familiar durante a cinética experimental, permanecendo alojado em gaiola individual por quatro meses, esse possível estresse gerado com o isolamento forçado pode ter resultado na liberação de certas citocinas que agem no sistema nervoso central inibindo o apetite, favorecendo a alteração na homeostase do organismo do animal.

O fato do animal sentinela 2 ter apresentado intensa tumefação celular por todo o ácido, nos faz analisar se essa lesão quando observada nos animais infectados está associada ao VDEN, entretanto, tumefação celular foi prevalente em todos os animais infectados durante a cinética da infecção primária quando comparados ao animal sentinela 1; essa prevalência nos animais infectados durante infecção primária e a detecção de antígenos do VDEN nos animais infectados, somados aos vários trabalhos descrevendo tumefação em fígados infectados com VDEN (Torres, 2005; Barth et al., 2006; Aye et al., 2014), sugerem que essa lesão nos animais infectados pelo VDEN observada em nosso estudo, também resulta da infecção experimental.

Hiperplasia e hipertrofia das células de Küpffer foi observada durante ambas as infecções primária e secundária. A descrição dessas alterações nas células de Küpffer é comum em fígados humanos de casos fatais por dengue grave (FHD) (Bhamarapravati *et al.*, 1967; Burke, 1968; Torres, 2005, Brasil, 2005; Aye *et al.*, 2014; Pagliari *et al.*, 2014). Histologicamente a hiperplasia e hipertrofia das células de Küpffer foi predominante nos animais infectados com VDEN quando comparados aos sentinelas, correlacionando com a maior expressão de lisozima (marcador de macrófagos ativado) nesses animais ao serem também comparados com os respectivos animais sentinelas.

Essa prevalência da hiperplasia e hipertrofia nas células de Küpffer nos primatas infectados em relação aos animais sentinelas, associado à detecção de antígenos do VDEN nessas células em nosso estudo, bem como, a demonstração experimental da capacidade do vírus em se replicar nas células de Küpffer (Jessie *et al.*, 2004), sugerem que os aspectos reacionais dessas células observados em nossa casuística decorram da ativação e da replicação do vírus nas mesmas.

Ao avaliarmos a intensidade da lesão hepática por fase das infecções foi possível observar que as lesões hepáticas foram proeminentes nos grupos Ag1 e Ag2 quando comparados aos grupos Conv.1 e Conv.2, não sendo observada diferença significativa entre Ag.1 e Ag.2, desta forma, demonstrando a capacidade da infecção sequencial pelo VDEN-3 e VDEN-2 nesta espécie e de causar lesões hepáticas; ainda interessante foi observar a mesma intensidade de lesão durante as duas infecções, sugerindo que apesar de não observarmos o favorecimento de um quadro de dengue grave pela infecção secundária heterotípica, também não houve por parte da resposta adaptativa uma proteção heterotípica eficaz, que impossibilitasse a manifestação de alterações histológicas no fígado durante a fase aguda da infecção secundária. Dessa forma, podemos hipotetizar que essas alterações encontradas no fígado dos saguis infectados possam também ocorrer durante a dengue (FD) em humanos, corroborando os estudos que demonstram alteração funcional no fígado de humanos com dengue (FD), sendo descritos de leve à moderada elevação nos níveis séricos das enzimas AST e ALT (Kuo *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 1997); a mesma elevação foi observada nos primatas em estudo durante infecção primária, tendo ocorrido elevação apenas de AST durante a infecção secundária (Ferreira, 2012). Esses achados estão de acordo com a literatura em humanos, em que níveis séricos de AST se apresentam mais elevados do que de ALT nas infecções por dengue (Gholson *et al.*, 1990).

A demonstração da lesão hepática significativamente mais intensa nos grupos Ag.1 e Ag.2 quando comparados aos grupos Conv.1 e Conv.2, pode estar associada à maior detecção de antígenos nos grupos da fase aguda quando comparada aos grupos da fase de convalescência das infecções experimentais, embora, essa ocorrência não tenha sido estatisticamente significativa. Essa associação entre intensidade da lesão hepática e frequência de antígenos do VDEN, somadas aos achados sobre a resposta imunológica celular e citocínica, podem sugerir que as lesões hepáticas em nossa casuística resultam do efeito citopático viral direto nos

hepatócitos, o que induziria resposta inflamatória decorrente da resposta imune do hospedeiro, sendo expressas *in situ* no fígado, e desta forma, contribuindo com a lesão hepática.

Ao avaliarmos a intensidade da lesão hepática por primata no estudo experimental com VDEN e, correlacionarmos com a idade dos mesmos, foi possível observar que os PNH (6 e 7 dpi primária e secundária) que estão dentro do grupo que apresentaram lesão hepática estatisticamente significativa ($\leq 0,005$), ou seja, mais intensa quando comparados ao demais, são os únicos animais idosos do estudo. Ainda, os PNH (30^o dpi primária e 15^o dpi secundária) que apresentaram lesão hepática significativamente menor do que os outros primatas em estudo são calitricídeos considerados jovens. Assim, podemos correlacionar e supor, uma possível influência da faixa etária do primata infectado na intensidade da lesão hepática; nesse tocante, não encontramos dados similares. Por outro lado, foi observado maior intensidade da lesão no fígado durante a fase aguda das infecções quando comparada à fase de convalescência; ressalta-se que a fase aguda das infecções primária e secundária foi composta por primatas adultos (5) e idosos (2), enquanto a fase de convalescência das infecções foi composta por quantidade maior de primatas jovens (3) do que de adultos (2). Esse possível favorecimento do avanço da idade na elevação da intensidade da lesão hepática, pode ser associada à diminuição da atividade imunitária e da maior parte das funções fisiológicas com o aumento da idade (Mota *et al.*, 2009).

Vale destacar que ao analisarmos a intensidade da lesão hepática do primata do 20^o dpi secundária, observou-se mínima alteração hepática (apenas tumefação), bem como, esse animal não apresentou imunomarcção de antígenos virais, entretanto, a confirmação da infecção pelo VDEN-2 foi realizada pela sorologia positiva (Ferreira, 2012). Podemos sugerir que as lesões encontradas nesse PNH podem ser decorrentes das alterações metabólicas sistêmicas devido à infecção viral no organismo, mas não pela ação direta do vírus no tecido.

As lesões hepáticas observadas em nosso estudo tiveram preferência acinar?

A necrose lítica e o infiltrado inflamatório nos animais infectados apresentaram padrão de distribuição mais prevalente em Z2, porém as demais lesões hepáticas observadas em nosso estudo não mostraram preferência topográfica significativa por alguma zona acinar, embora tenha sido observada uma tendência maior dessas lesões ocorrerem em Z2 seguido de Z3, como observada na esteatose. Na dengue grave essa localização preferencial das lesões hepáticas por Z2, seguido com menos intensidade e com menor extensão por Z3, são constantemente descritas na literatura (Bhamararava *et al.*, 1967; Courvelad *et al.*, 1999; Huerre *et al.*, 2001; Brasil, 2005; Aye *et al.*, 2014). Ressalta-se que esse quadro histopatológico preferencial por Z2 é utilizado para o diagnóstico da febre amarela, sendo considerado característico, embora não patonômico, dessa infecção (Rocha-Lima, 1912; Vieira *et al.*, 1983; Quaresma, 2007).

Explicações ou hipóteses para a preferência das lesões hepáticas por Z2 na dengue ainda permanecem por ser descritas, porém sabemos das diferenças no fluxo sanguíneo característico de cada zona acinar e na heterogeneidade entre os hepatócitos de cada zona (Jugermann & Katz, 1989). Sendo assim, diferentes situações de aporte sanguíneo no fígado podem resultar em lesões de hepatócitos em localizações específicas. O choque hipovolêmico na dengue grave (FHD/SCD) determina situação de hipofluxo para o fígado, alterando o aporte sanguíneo de forma variável nas diferentes zonas acinares, a Z2 representaria a transição entre as regiões de anóxia (Z3) e normóxia (Z1), ou seja, seria uma região submetida a um regime de hipóxia, e de fato, esse mecanismo foi descrito por Marotto *et al.* (1998) em estudos experimentais em fígados de ratos durante quadro de hipóxia induzida por baixo fluxo, e foi demonstrado o desenvolvimento de áreas de necrose concentradas em Z2. Tecidos em situação de hipóxia tem concentração de O₂ suficiente para servir de combustível na formação de superóxidos, esses radicais livres derivados de O₂ e seus metabólitos causariam lesão e morte das células em Z2 (McCord, 1985).

A associação do hipofluxo para o fígado resultando na preferência das lesões hepáticas por Z2, não pode ter sido determinante em nossa casuística, haja vista, que não foi observado dengue grave, tampouco choque hipovolêmico; semelhantes

aos nossos achados Vieira *et al.* (1983) identificaram em duas biópsias de pacientes com FA a presença de lesão em Z2 característica, mas sem distúrbios hemorrágicos subjacentes. A prevalência de necrose lítica por Z2, tendência de esteatose por Z2, aliados à detecção de antígeno viral e infiltrado inflamatório predominantes em Z2 observados em nosso estudo, podem ou não supor um possível tropismo do vírus dengue por essa região, podendo ser favorecido por distúrbios hemodinâmicos.

A resposta inflamatória hepática no fígado dos calitricídeos estudados

Em nosso estudo observamos discreto infiltrado inflamatório lobular constituído predominantemente por linfócitos, macrófagos e neutrófilo, com distribuição preferencial por Z2, além de discreto infiltrado inflamatório portal (linfócitos, macrófagos e neutrófilo), e centrolobular prevalecendo linfócitos e macrófagos. O leve infiltrado inflamatório durante a dengue grave é descrito na literatura, sempre ressaltando a desproporção entre o grau da lesão nos hepatócitos, a extensão da apoptose e da necrose com a densidade do infiltrado inflamatório (Courvelad *et al.*, 1999; Huerre *et al.*, 2001; Brasil, 2005; Aye *et al.*, 2014; Pagliari *et al.*, 2014), essa desproporção também é observada na FA, sendo associada ao intenso grau de apoptose como principal causa de morte nos hepatócitos (Hudson, 1928; Vieira *et al.*, 1983; Quaresma *et al.*, 2007; 2013), Brasil (2005) também justificou o reduzido infiltrado inflamatório nas áreas de lesão tecidual hepática, observados em seu estudo, com a demonstração da maior participação da apoptose sobre a necrose em hepatócitos de fígados de casos fatais com dengue grave (FHD/SCD).

Embora nossa casuística tenha apresentado discreto acometimento do parênquima hepático compatível ao discreto infiltrado inflamatório, observamos maior prevalência de apoptose sobre a necrose na Ag.1. Porém, vale ressaltar que as duas causas de morte nos hepatócitos apresentaram-se discretamente no parênquima hepático, e aliado à preferência na distribuição de necrose e infiltrado inflamatório por Z2, podemos sugerir relação do infiltrado inflamatório com a necrose, haja vista, que esta forma de morte celular desencadeia o recrutamento de células inflamatórias como parte da reação inflamatória para eliminação (clearance) das células mortas.

Evidências da participação da apoptose na migração dos neutrófilos para a zona da lesão têm sido descrita, sendo atribuído o desencadeamento desse mecanismo por ativação de receptores Fas que resultaria na síntese de quimiocinas levando a esse acúmulo de neutrófilos (Park, et al. 2002), desta forma, a apoptose também poderia, eventualmente, influenciar na densidade do infiltrado inflamatório. Outro dado interessante observado em nosso estudo, que fortalece a sugestão da influência no infiltrado inflamatório pela necrose e também apoptose, é que os corpúsculos de Councilman foram observados sempre ao redor de focos necróticos, ou seja, sempre próximos aos focos inflamatórios, bem como, a proteína Fas foi expressa na infecção secundária próximo aos focos necróticos quando não mais foram observados os corpúsculos de Councilman. Essa distribuição dos corpúsculos de Councilman ao redor de focos necróticos também foi observada em fígado de humanos com dengue grave fatal (Couvelard et al., 1999; Huerre et al. 2001).

Apesar das lesões hepáticas serem proporcionais ao infiltrado inflamatório, a expressão de TGF- β pode ter, em parte, colaborado no discreto infiltrado inflamatório, haja vista, que esta citocina tem importante ação anti-inflamatória além de ser indutor de apoptose, e pode-se relacionar com sua expressão durante todo o experimento em saguis infectados com VDEN, prevalecendo no grupo Ag.1 (VDEN-3). Esses resultados são similares aos observados em casos humanos fatais de febre amarela (Quaresma *et al.*, 2005; 2007; 2013) e dengue (Brasil, 2005; pagliari *et al.*, 2014).

Em nossos achados observamos aumento de células NK no acino hepático dos grupos de primatas infectados quando comparados com o respectivo animal sentinela, com maior expressão de NK na fase aguda primária, corroborando com Brasil (2005) que também observou em fígados de humanos com dengue grave (FHD/SCD), um número relativamente aumentado dessas células distribuídas tanto nas zonas acinares como nos EP, porém, em nosso estudo, o aumento de células imunomarcadas não foi demonstrado nos EP e VHC.

Sabe-se que INF, IL-2, bem como, uma variedade de glicoproteínas virais ativam as células NK, conseqüentemente, um aumento dessas células e da sua resposta pode ser visto nos primeiros dias de infecção (Scroferneker & Pohlmann, 1998). Alinhado com esses dados, observamos o pico de expressão de NK com 3 e 4 dpi primária e de IFN- γ com 2 e 5 dpi primária. O estudo experimental com VDEN demonstrou que as células NK exercem seu papel promovendo lise das células

(Kurane et al., 1990), bem como, em outras infecções virais experimentais, foi observado a indução de apoptose de hepatócitos por essas células (Liu et al., 2000). Vale ressaltar que a apoptose de hepatócitos em nossa casuística foi mais prevalente, assim como as células NK, no grupo Ag.1., desta forma, podemos propor possível participação dessas células na indução de morte por apoptose das células infectadas nos saguis experimentalmente infectados.

As células NK além de destruírem células infectadas por vírus produzem INF- γ que ativa macrófagos, uma vez ativadas, estas células secretam radicais livres derivados do oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO), TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 entre outros produtos; A análise de nossos resultados nos permitiram observar que INF- γ , células de Küpffer e TNF- α apresentaram maior positividade nos grupos dos primatas infectados quando comparados aos animais sentinelas, bem como, células de Küpffer e TNF- α apresentaram maior prevalência na infecção secundária, considerando uma possível relação entre o aumento no número de células de Küpffer ativadas resultando em um aumento da síntese de TNF- α . Em humanos, Brasil (2005), ao quantificar essa citocina em fígados de pacientes com dengue grave (FHD/SCD) fatal e comparar com os fígados do grupo controle também observou maior prevalência de TNF- α com imunomarcacão em células de Küpffer nos pacientes com dengue.

A principal função fisiológica do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar essas células para eliminar microorganismos (Abbas *et al.*, 2008), em nosso estudo foi possível observar neutrófilos durante todo o experimento, mas um dado interessante que vale relatar é que 60% das células marcadas com anticorpos anti-S100, eram neutrófilos, haja vista, que a proteína S100A12 constitui 5% da proteína citosólica dos neutrófilos, desta forma, é válido supor uma associação entre TNF- α e neutrófilos, utilizando a imunomarcacão para APC. A quantidade de células positivas para proteína S100 foi maior nos primatas infectados com VDEN quando comparados ao animal sentinela, com maior ocorrência no grupo Ag.1 e Conv.2, tanto células de Küpffer quanto TNF- α e IL-8 (citocina com papel relevante na ativação e migração de neutrófilos). Essas citocinas também mostraram grande presença no grupo Conv.2. sugerindo um possível efeito imunológico em cascata iniciado com liberaçãõ de IFN- γ , seguido por

ativação de células de Küpffer resultando em liberação de TNF- α e IL-8, que levaria ao recrutamento de neutrófilos.

Outra função do TNF é fazer com que as células do endotélio vascular expressem moléculas de adesão que tornam a superfície endotelial adesiva para neutrófilos e subsequentemente para monócitos e linfócitos (Abbas *et al.*, 2008). É fato que a molécula de adesão VCAM tem sido observada no sangue em níveis elevados durante o período febril da infecção por dengue, sendo descrita significativa associação entre determinados níveis e a FHD (Huang *et al.*, 2001Torres). Em nosso estudo foi avaliada a expressão da VCAM-1, sendo observado o aumento durante a infecção secundária (VDEN-2) quando comparada com o animal sentinela. Assim, sugerimos uma possível influência do TNF- α , que também mostrou-se aumentado durante as infecções primária e secundária; essa modulação da função da célula endotelial durante a infecção pelo VDEN por meio do TNF- α foi anteriormente observada por Anderson *et al.* (1997) em estudo com cultura de monócitos infectados e tratada com um anticorpo anti-TNF- α .

O fígado possui vários tipos de células com função de APC como, por exemplo, células endoteliais sinusoidais, células de Küpffer e células dendríticas (Lau & Thompson, 2002), e após o vírus infectar essas células ocorre a fase de processamento e apresentação do antígeno às células TCD4+. Neste estudo a imonmarcação dessas células foram escassas no ácino hepático, bem como, nos EP e VHC, entretanto, os linfócitos foram predominantes nos infiltrados inflamatórios em todas as fases da infecção, sugerindo frequência maior dos linfócitos TCD8 e/ou linfócitos B; no entanto, não foi possível padronizarmos a utilização do anticorpo anti LT-CD8 de humanos nos primatas em estudo, a fim de obtermos a sua quantificação por imunohistoquímica, o que limitam essa análise.

Embora a frequência de linfócitos B tenha sido maior do que de linfócitos TCD4, a marcação foi tênue no local das lesões e isto sugere um desempenho local menos decisivo no desencadeamento das lesões hepáticas descritas nesse estudo; pode-se supor que a população linfocitária predominante no infiltrado inflamatório é de linfócitos TCD8, que devem estar exercendo sua função local de citotoxicidade já evidenciada em outros estudos (Livingston *et al.*, 1995; Azeredo *et al.*, 2001). Desta forma, Couverlad *et al.* (1999) também descreveram predominância de linfócitos T sobre os B *in situ* no fígado de caso humano de dengue grave (FHD/SCD), e o predomínio dos linfócitos TCD8 sobre os linfócitos TCD4 também foi observado por

Chen *et al.* (2004) em infiltrado celular hepático de ratos imunocompetentes infectados por VDEN, de fato, a maior expressão de linfócitos TCD8 na população linfocitária é comumente relatada no sangue periférico (Boonpucknavig *et al.*, 1979; Wlls *et al.*, 1980; Homchampa *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 2002); entretanto, contestando esses achados, Brasil (2005) descreveu significativo predomínio de linfócitos TCD4 sobre os linfócitos TCD8 expressos nas lesões hepáticas e nos EP de casos fatais de humanos com dengue grave (FHD/SCD).

Nesta tese, a frequência de linfócito TCD4+ foi maior na infecção primária (VDEN-3), com maior prevalência no grupo Ag.1 quando comparada com o grupo Conv.1 e com o animal sentinela 1. É interessante assinalar que as fases da infecção secundária (VDEN-2) não apresentaram diferença na expressão de células TCD4+ quando comparadas ao animal sentinela 2. É bem conhecido que esses linfócitos ativados podem induzir alterações na resposta imune através da produção de citocinas, e ao analisarmos a expressão de citocinas neste estudo, foi possível observar um aumento na frequência de IFN- γ , TNF- α e IL-10 nos primatas infectados quando comparados ao animal sentinela, corroborando com os achados de Brasil (2005) que também observou o aumento dessas citocinas nos fígados humanos de casos fatais com dengue grave (FHD/SCD) quando comparados ao grupo controle.

Ferreira *et al.* (2012) analisaram por citometria de fluxo a detecção de citocinas no sangue periférico dos mesmos primatas deste estudo e observaram durante a infecção primária aumento nos níveis de IFN- γ (3, 6 e 20 dpi) e TNF- α (3 dpi), enquanto na infecção secundária foi evidenciado diminuição dessas citocinas, IFN- γ (2, 5, 45 dpi) e TNF- α (3, 5 e 45 dpi). É importante ressaltar que a expressão de IFN- γ no fígado desses animais não apresentou esse declínio durante a infecção secundária, mantendo-se constante durante todo o experimento; essa constância pode estar relacionada com a detecção de antígenos que também foi observada em todas as fases das infecções primária e secundária, bem como a participação de células de Küpffer ativadas, linfócito TCD4, e possivelmente linfócitos TCD8. De fato, estudos *in vitro* demonstraram que durante infecção pelo vírus dengue os linfócitos TCD8 são capazes de produzir IFN- γ , além de IL-2, IL-4 e TNF- β , porém, sempre em menor proporção que a produção dessas citocinas pelos linfócito TCD4 (Mori *et al.*, 1997). Neste estudo, não foi observada diminuição na expressão de TNF- α no fígado dos primatas estudados durante a infecção secundária, tal como no sangue

periférico, entretanto, o que observamos foi um aumento dessa citocina *in situ* no fígado que associamos ao aumento significativo no número de células de Küpffer ativadas durante a infecção secundária.

Gagnon *et al.* (1999; 2001) ao estudar clones de células TCD4+ específicos de dengue demonstraram que IFN- γ é a citocina produzida com maior intensidade pela totalidade das células, evidenciando um padrão de resposta Th1, seguida de TNF- α e - β com intensidade variável; nossos resultados não possibilitaram analisar um padrão de resposta imune adaptativa localmente no fígado, haja vista, que não foi possível padronizar alguns anticorpos de humanos (para uso nos saguis), e que são essenciais para traçar um padrão de resposta imune, como por exemplo IL-4 que é produzida intensamente por células Th2, porém, vale ressaltar que houve aumento da expressão do IFN- γ durante todo o experimento, que aliado ao aumento no número de células de Küpffer (subpopulação de Th1 tem intensa atividade na ativação de macrófagos), bem como, aumento de IL-10 apenas na infecção primária com diminuição gradual entre Ag.1 e Conv.1, podemos sugerir participação do perfil Th1 *in situ* no fígado dos primatas estudados, corroborando com achados no soro e fígado de humanos com dengue (Yang *et al.*, 2001; Brasil, 2005) .

Conceitualmente, hepatite significa qualquer lesão inflamatória do fígado, embora a aparência e distribuição da lesão tendam a variar com a etiologia (Lefkowitz, 2010), Neste estudo as características morfológicas gerais das hepatites virais agudas e crônicas foram avaliadas semi-quantitativamente em cada animal; tendo sido observada somente características de hepatite aguda. Com o intuito de descrever possível ocorrência de hepatite aguda por grupo, foi realizada em cada grupo a média da somatória dos escores de alguns parâmetros referentes à hepatite aguda (morte celular, inflamação e tumefação), no entanto, foram atribuídos escores específicos levando em consideração somente a importância patológica desses eventos na evolução para uma hepatite. Assim, diferença estatística significativa foi observada entre a fase aguda das infecções primária e secundária quando comparadas aos respectivos animais sentinelas, dessa forma, foi possível demonstrar hepatite aguda nos saguis durante a fase aguda das infecções, bem como, maior prevalência dessas lesões na fase aguda da infecção primária que corroborou com aumento dos níveis séricos das enzimas ALT e AST nos primatas do grupo Ag.1 (Ferreira *et al.*, 2014).

Através das análises semi-quantitativas das lesões hepáticas, das pesquisas sobre a resposta imunológica celular e citocínica nesses animais, aliado ao aumento dos níveis de ALT e AST, observou-se tratar de discreta hepatite aguda durante a fase aguda da infecção sequencial nos saguis experimentalmente infectados por VDEN-3 e VDEN-2.

A presença de hepatite aguda apenas nos grupos pertencentes à fase aguda corrobora com o fato que a dengue é uma doença de caráter agudo e auto-limitada, entretanto, foi de extrema importância o estudo das fases de convalescência, pois possibilitou observar presença de antígenos virais, algumas lesões, inflamação e alteração hepatocitária regenerativa nos tecidos, sendo que a regeneração binucleada foi observada apenas em Conv.1, podendo ser associada com a prevalência das lesões no grupo Ag.1.

5 CONCLUSÕES

1. Os PNH da espécie *Callithrix penicillata* foram suscetíveis à replicação sequencial do VDEN-3 e VDEN-2 no fígado, havendo expressão de antígenos virais em hepatócitos, células de Küpffer e corpúsculos de Councilman;
2. As alterações histopatológicas nos fígados dos primatas da espécie *Callithrix penicillata* foram semelhantes aos observados em casos fatais de dengue em humanos, porém com intensidade e amplitude menor.
3. O comprometimento histopatológico foi caracterizado por presença de apoptose, focos de necrose lítica, esteatose, tumefação celular, inflamação (acinar, EP e VHC), hiperplasia/hipertrofia em células de Küpffer, hemossiderina em células de Küpffer e dilatação dos sinusóides.
4. A apoptose foi a forma predominante de morte em hepatócitos na fase aguda da infecção primária, com possível participação de TNF- α e TGF- β na indução de apoptose.
5. A intensidade da lesão hepática foi proeminente na fase aguda das infecções. Não houve diferença significativa entre fase aguda da infecção primária (VDEN-3) com fase aguda da infecção secundária (VDEN-2).
6. A necrose lítica e o infiltrado inflamatório apresentaram padrão de distribuição predominante significativamente em Z2, as demais lesões hepáticas apresentaram tendência por Z2 seguido de Z3.
7. O discreto acometimento do parênquima hepático foi compatível ao pouco infiltrado inflamatório observado, que foi constituído predominantemente por linfócitos, macrófagos e neutrófilos.
8. Foi marcante o aumento na expressão acinar de macrófagos ativados, células NK e proteína S-100 durante a fase aguda e convalescente das infecções

- primária e secundária, com predominância de macrófagos na infecção secundária, de células NK na fase aguda da infecção primária e de proteína S-100 nas fases aguda primária e convalescente secundária.
9. Houve aumento na expressão acinar de linfócitos TCD4+ durante a fase aguda da infecção primária; aumento na expressão de linfócitos B durante a fase aguda e convalescente das infecções primária e secundária, com prevalência significativa na fase aguda da infecção primária, sugerindo que a população linfocitária predominante no infiltrado inflamatório foi de linfócitos TCD8+.
 10. Ocorreu, aumento na expressão acinar de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , TNF- α e IL-8, com prevalência significativa de TNF- α na fase de convalescência da infecção secundária e de IL-8 na fase aguda da infecção secundária.
 11. Foi observado aumento na expressão acinar de citocinas anti-inflamatórias , TGF- β e IL-10, com prevalência significativa na fase aguda da infecção primária.
 12. Ocorreu aumento na expressão acinar da proteína Fas durante a fase aguda das infecções primária e secundária.
 13. Houve aumento na expressão acinar de VCAM nos sinusóides durante a fase aguda da infecção secundária, bem como, aumento na expressão nos EP.
 14. Observou-se discreta hepatite aguda durante a fase aguda da infecção sequencial pelo VDEN-3 e VDEN-2.
 15. As lesões observadas no fígado dos calitricídeos experimentalmente estudados sugerem que possam também ocorrer durante a dengue (FD) em humanos.

16. Os PNH da espécie *Callithrix penicillata* demonstraram ser um bom modelo experimental para estudos imunopatológicos da infecção pelo VDEN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOT, D.H., BARNETT, D.K., COLMAN, R.J., YAMAMOTO, M.E., DARKEN-SCHULTZ, N.J. Aspects of common marmosets basic biology and life history important for biomedical research. **Comparative medicine**. **53** (4): 339-350, 2003.
- ACOSTA, E.G., CASTILLA, V., DAMONTE, E.B. Functional entry of dengue vírus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **J Gen Virol** **89** (Pt 2): 474-84, 2008.
- ALENCAR, A.I., YAMAMOTO, M.E., OLIVEIRA, M.S., LOPES, F.A., SOUSA, M.B., SILVA, N.G. Behavior and progesterone levels in *Callithrix jacchus* females. **Braz J Med Biol Res**. **28** (5): 591-5, 1995.
- ALI, M., WAGATSUMA, Y., EMCH, M., BREIMAN, R.F. Use of a geographic information system for defining spatial risk for dengue transmission in Bangladesh: role for *Aedes albopictus* in an urban outbreak. **Am J Trop Med Hyg** **69** (6): 634-40, 2003.
- ALVES, V.A.F.; CHAPCHAP, P.; MENEZES, Y. Anatomia, embriologia e histologia. In: GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. **Doenças do fígado e vias biliares**. São Paulo, Ateneu, 2001, p.5-18.
- ANDERSON, R., WANG, S., OSIOWY, C., ISSEKUTZ, A.C. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. **J Virol**. **71** (6): 4226-32, 1997.
- ASHOUR, J., MORRISON, J., LAURENT-ROLLE, M., BELICHA-VILLANUEVA, A., PLUMLEE, C.R., BERNAL-RUBIO, D., WILLIAMS, K., HARRIS, E., FERNANDEZ-SESMA, A., SCHINDLER, C., GARCÍA-SASTRE, A. Mouse STAT2 Restricts Early Dengue Virus Replication. **Cell Host Microbe**. **8** (5): 410–421, 2010.
- ATTISANO L, WRANA JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. **Science**. 31; 296 (5573):1646-7, 2002.
- AYE KS, CHARNGKAEW K, WIN N, WAI KZ, MOE K, PUNYADEE N, THIEMMECA S, SUTTITHEPTUMRONG A, SUKPANICHNANT S, PRIDA M, HALSTEAD SB. Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from Myanmar. **Hum Pathol**. 45(6):1221-33, 2014.
- BARBOSA, M. L.; ROCCO, I. M.; FELIPPE, J. M. M. S; CRUZ, A. S. Growth and maintenance of *Aedes Albopictus* cell line, clone C6/36, in different media. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, São Paulo, v. 53, n.1/2, p. 63-70, 1993.

- BARTH OM, BARRETO DF, PAES MV, TAKIYA CM, PINHÃO AT, SCHATZMAYR HG. Morphological studies in a model for dengue-2 virus infection in mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 101(8):905-15, 2006.
- BASÍLIO-DE-OLIVEIRA, C.A., AGUIAR, G.R., BALDANZA, M.S., BARTH, O.M., EYER-SILVA, W.A., PAES, M.V. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis.** 9 (4): 341-7, 2005.
- BASU, A., CHATURVEDI, U.C. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 53 (3): 287-99, 2008.
- BEATY, B. Arboviruses. In: Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, Lennette et al (ed.). American Public Health Association, Washington, 1995. P. 189-212.
- BENTE, D.A., MELKUS, M.W., GARCIA, J.V., RICO-HESSE, R. Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. **J Virol.** 79 (21): 13797-9, 2005.
- BHAMARAPRAVATI N, TUCHINDA P, BOONYAPAKNAVIK V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. **Ann Trop Med Parasitol;** 61(4):500-10, 1967.
- BHAMARAPRAVATI, N. Pathology of dengue infections, in: Gubler, D.J., Kuno, G. (Eds), Dengue and Dengue Haemorrhagic fever. Cambridge University Press, Cambridge, 1997, pp. 115-132.
- BHATT, S., GETHING, P.W., BRADY, O.J., MESSINA, J.P., FARLOW, A.W., MOYES, C.L., DRAKE, J.M., BROWNSTEIN, J.S., HOEN, A.G., SANKOH, O., MYERS, M.F., GEORGE, D.B., JAENISCH, T., WINT, G.R.W, SIMMONS, C.P., SCOTT, T.W., FARRAR, J.J., HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature:** 1-4, 2013.
- BRADHAM CA, QIAN T, STREETZ K, TRAUTWEIN C, BRENNER DA, LEMASTERS JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. **Mol Cell Biol.** 18(11):6353-64, 1998.
- BRAGA, E.L., MOURA, P., PINTO, L.M., IGNÁCIO, S.R., OLIVEIRA, M.J., CORDEIRO, M.T., KUBELKA, C.F. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 96 (2): 229-32, 2001.
- BRACK M, ROTHE H. Chronic tubulointerstitial nephritis and wasting disease in marmosets (*Callithrix jacchus*). **Vet Pathol.** 18(Suppl 6):45-54, 1981.

- BRASIL, R.A. **Caracterização do fenótipo da resposta inflamatória, da expressão de citocinas e do mecanismo de morte celular no fígado de pacientes com febre hemorrágica da dengue.** Tese de doutorado da Universidade de São Paulo, USP. São Paulo, 2005, 148.
- BRASIL, Ministério da Saúde; **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 7 ed., 2009.
- BRAVO, J.R., GUZMÁN, M.G., KOURI, G.P. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Trans R Soc Trop Med Hyg** **81** (5): 816-20, 1987.
- BURKE, T. Dengue haemorrhagic fever: a pathological study. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 62(5): 682-92, 1968.
- CASTERA. L., PAWLOTSKY, J.M. Noninvasive diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Med Gen Med.** 9;7(4):39, 2005.
- CHALIFOUX LV, BRONSON RT, ESCAJADILLO A, MCKENNA S. An analysis of the association of gastroenteric lesions with chronic wasting syndrome of marmosets. **Vet Pathol Suppl.** 19 Suppl 7:141-62, 1982.
- CHANG, D.M., SHAIQ, M.F. Production of interleukin-1 (IL-1) and IL-1 inhibitor by human monocytes exposed to dengue virus. **J Infect Dis.** **170** (4): 811-7, 1994.
- CHUNGUE, E., POLI, L., ROCHE, C., GESTAS, P., GLAZIOU, P., MARKOFF, L.J. Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. **J Infect Dis.** **170** (5): 1304-7, 1994.
- COUTINHO, P.E., CORRÊA, H.K. Polygyny in a free-ranging group of buffy-tufted-ear marmosets, *Callithrix aurita*. **Folia Primatol.** **65** (1): 25-9, 1995.
- COUVERLARD, A., MARIANNEAU, P., BEDEL, C., DROUET, M.T., VACHON, F.L., HENIN, D., DEUBLE, V. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. **Hum Pathol.** 30, 1106-1110, 1999.
- 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 causado pelo vírus dengue, relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical** n. 42, p. 484, 2009.
- DESPRÈS, P., FLAMAND, M., CECCALDI, P.E., DEUBEL, V. Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. **J Virol.** **70** (6): 4090-6, 1996.

- DESPRÈS, P., FRENKIEL, M.P., CECCALDI, P.E., DUARTE DOS SANTOS, C., DEUBEL, V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. **J Virol.** **72** (1): 823-9, 1998.
- DEV, A., PATEL, K., MCHUTCHISON, J.G. Hepatitis C and Steatosis. **Clin Liver Dis.** 8(4):881-92, 2004.
- DHAWAN, S. et al. Human immunodeficiency virus-1-tat protein induces the cell surface expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecules-1, and intercellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells. **Blood** **90**: 1535-1544, 1997.
- DIGBY, L.J., BARRETO, C.E. Social organization in a wild population of *Callithrix jacchus*. I. Group composition and dynamics. **Folia Primatol.** **61**(3): 123-34, 1993.
- ELDEMAN, R. Evaluation of the plasma kinin system in dengue hemorrhagic fever. *J. lab. Clin. Med.* **86** (3): 410-421, 1973.
- ESPINA, L.M., VALERO, N. & MOSQUERA.J. Induction of apoptosis in cultured human monocytes by type 2 dengue virus. In: International Congress on Infectious Diseases, 9, Buenos Aires, Argentina, 2000, p. 305.
- FALCONAR, A.K. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Arch Virol.** **142** (5): 897-916, 1997.
- FARIA, D.S. O estudo de campo do mico-estrela *Callithrix penicillata* do Planalto Central brasileiro. In: **Etologia de animais e de homens**. São Paulo: Edicon, 1986.p. 109-121.
- FERREIRA, M.S. **Estudo experimental sobre a resposta imunológica em infecções sequenciais pelo vírus dengue 3 pelo vírus dengue 2 em primatas não humanos da espécie *Callithrix penicillata***. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Belém, Universidade Federal do Pará, 2012. 100p.
- FERREIRA MS, DE CASTRO PH, SILVA GA, CASSEB SM, DIAS JÚNIOR AG, RODRIGUES SG, AZEVEDO RDO S, COSTA E SILVA MF, ZAULI DA, ARAÚJO MS, BÉLA SR, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, VASCONCELOS PF. *Callithrix penicillata*: a feasible experimental model for dengue virus infection. **Immunol Lett.** 158(1-2): 126-33, 2014.

- FONSECA, B.A.L. & FIGUEIREDO, L.T.M. Dengue. In: **Tratado de Infectologia**. Focaccia, R. & Veronesi, R., (Ed.) v. 1, São Paulo, Atheneu, 2005. P. 289-302.
- FRESH, J.W., REYES, V., CLARKE, E.J., UYLANGCO, C.V. Philippine hemorrhagic fever: a clinical, laboratory, and necropsy study. **J Lab Clin Med** **73**: 451-458, 1969.
- GAGNON, S.J., MORI, M., KURANE, I., GREEN, S., VAUGHN, D.W., KALAYANAROOJ, S., SUNTAYAKORN, S., ENNIS, F.A., ROTHMAN, A.L. Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. **J Med Virol** **67** (1): 41-6, 2002.
- GLASSER, C.M., DONALÍSIO, M.R. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Rev. Brasileira de Epidemiologia** **5** (3): 259-270, 2002.
- GOMES, C.R.P., CRUZ, E., FILÁRTIGA, D. & AQUINO, D. Imunopatologia da Dengue Clássica e da Dengue Hemorrágica; In: **Dengue - Diagnóstico, Tratamento e Prevenção**. 2. ed. Editora Rubio Ltda, 2008. P. 38-43.
- GÓMEZ-DANTES, H., WILLOQUET, JR. (2009). **Dengue in the Americas: challenges for prevention and control**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 25 Sup 1:S19-S31.
- GRAHAM, R.R., JUFFRIE, M., TAN, R., HAYES, C.G., LAKSONO, I., MA'ROEF, C., SUTARYO, E., PORTER, K.R., HALSTEAD, S.B. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I, studies in 1995–1996. **Am J Trop Med Hyg** **61**: 412–419, 1999.
- GREEN, S., PICHYANGKUL, S., VAUGHN, D.W., KALAYANAROOJ, S., NIMMANNITYA, S., NISALAK, A., KURANE, I., ROTHMAN, A.L., ENNIS, F.A. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis.** **180** (5):1429-35, 1999.
- GREEN, S., VAUGHN, D.W., KALAYANAROOJ S, NIMMANNITYA S, SUNTAYAKORN S, NISALAK A, LEW R, INNIS BL, KURANE I, ROTHMAN AL, ENNIS FA. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. **J Infect Dis.** **179** (4): 755-62, 1999.
- GUBLER DJ, KUNO G, SATHER GE, VELEZ M, OLIVER A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am J Trop Med Hyg.** **33** (1):158-65, 1984.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas. **P R Health Sci J** **6**: 107-111, 1987.

- GUBLER, D.J. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 10: 480-496, 1998.
- GUBLER, D.J. Meltzer M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv. Virus Res.* 53:35-70, 1999.
- GUEDES, F. et al. The effects of human herpesvirus 8 infection and interferon- γ response in cutaneous lesions of Kaposi sarcoma differ among human immunodeficiency virus-infected and uninfected individuals. *BJD British Journal of Dermatology* 159: 839-846, 2008.
- GUNTHER J., MARTÍNEZ-MUÑOZ, J.P., PÉREZ-ISHIWARA, D.G., SALAS-BENITO J. Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. ***Intervirology* 50** (5): 347-52, 2007.
- GUZMAN, M.G., KOURI, G. Dengue: an update. ***Lancet Infect Dis.* 2** (1): 33-42, 2002.
- HALL, W.C., CROWELL, T.P., WATTS, D.M., BARROS, V.L., KRUGER, H., PINHEIRO F, PETERS CJ. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin – embedded human liver by immunohistochemical analysis. ***Am J Trop Med Hyg* 45**: 408-417, 1991.
- HALSTEAD, S.B., CHOW, J.S., MARCHETTE, N.J. Immunological enhancement of dengue virus replication. ***Nat New Biol.* 243** (122): 24-6, 1973.
- HALSTEAD, S.B., SHOTWELL, H., CASALS, J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I. Clinical laboratory responses to primary infection. ***J Infect Dis.* 128** (1): 7-14, 1973.
- HALSTEAD, S.B., SHOTWELL, H., CASALS, J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. II. Clinical laboratory responses to heterologous infection. ***J Infect Dis.* 128** (1): 15-22, 1973.
- HALSTEAD, S.B. Dengue hemorrhagic fever – a public health problem and a field for research. ***Bull Wrlld Hlth Org.* 58**: 1-20, 1980.
- HALSTEAD, S.B. Dengue: hematologic aspects. ***Seminars in Hematology* 19**: 116-131, 1982.
- HETHERINGTON, C.M. Circadian oscillations of body temperature in the marmoset, *Callithrix jacchus*. ***Laboratory animals.* 12**: 107-108. 1978.
- HUANG, Y.H., LEI, H.Y., LIU, H.S., LIN, Y.S., LIU, C.C., YEH, T.M. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. ***Am J Trop med Hyg.* 63** (1-2): 71-5, 2001.

- HUERRE MR, LAN NT, MARIANNEAU P, HUE NB, KHUN H, HUNG NT, KHEN NT, DROUET MT, HUONG VT, HA DQ, BUISSON Y, DEUBEL V. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. **Virchows Arch.** 438(2):107-15, 2001.
- HSU, S.M., RAINE, L., FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. **J. Histochem. Cytochem** 29: 577-580, 1981.
- IBÁÑEZ-BERNAL, S., BRISEÑO, B., MUTEBI, J.P., ARGOT, E., RODRÍGUEZ, G., MARTÍNEZ-CAMPOS, C., PAZ, R., DE LA FUENTE-SAN ROMÁN, P., TAPIA-CONYER, R., FLISSER, A. First record in Ameica of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. **Med Vet Entomol** 11 (4): 305-309, 1997.
- ICTV (2012) **Virus Taxonomy. Ninth report of International Committee of Taxonomy of Virus.** Elsevier, San Diego, +1259p;
- IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. **J Gen Virol.** 40 (3): 531-44, 1978.
- JUMALI, S., GUBLER, D.J., NALIM, S., ERAM, S., SULIANTI SAROSO, J. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonésia. III. Entomological studies. **Am J Trop Med Hyg** 28 (4): 717-724, 1979.
- JUNGERMANN, K.; KATZ, N. A functional specialization of different hepatocyte populations. **Physiol. Rev.** v.69, p.708–769, 1989.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** São Paulo, Guanabara Kogan, 1991.
- KARP, C.L., WYSOCKA, M., WAHL, L.M., AHEARN, J.M., CUOMO, P.J., SHERRY, B., TRINCHIERI, G., GRIFFIN, D.E. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. **Science** 273 (5272): 228-3, 1996.
- KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. **Histologia e Biologia Celular.** Rio de Janeiro, Elsevier, 2012. 514-525p.
- KITTIGUL, L., TEMPROM, W., SUJIRARAT. D., KITTIGUL, C. Determination of tumor necrosis factor-alpha levels in dengue virus infected patients by sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. **J Virol Methods.** 90 (1): 51-7, 2000.

- KOURÍ, G., GUZMAN, M.G., BRAVO, J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. **Bull Pan Am Health Organ** 20: 24-30, 1986.
- KYLE, J.L., HARRIS, E. Global Spread and Persistence of Dengue. **Annu Rev Microbiol** 62: 71-92, 2008.
- KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N., MITCHELL, R.N. **Robbins Patologia Básica**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008. 1027p.
- KUNO G, GÓMEZ I, GUBLER DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Trop Med Hyg.** 36(1):153-9, 1987.
- LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J.; VORNDAM, A. V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology** 30: 545-551, 1992.
- LEI, H.Y., YEH, T.M., LIU, H.S., LIN, Y.S., CHEN, S.H., LIU, C.C. Immunopathogenesis of dengue virus infection. **J Biomed Sci** 8 (5): 377-88, 2001.
- LIBRATY, D.H., PICHYANGKUL, S., AJARIYAKHAJORN, C., ENDY, 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** 75 (8): 3501-8, 2001.
- LINDERBACH, B.D. & RICE C.M. (2003) Molecular Biology of Flaviviruses. In: **The Flaviviruses: Pathogenesis and Immunity**. Chambers, T.J. & Monath, T.P. (1). California, Elsevier Academic Press, 2003. P. 23-47.
- LORENZI, J.C.C. Resposta imune contra infecções virais. **Scire Salutis** 1 (2): 35-43, 2011.
- MACHADO, P.R. L., ARAÚJO, M.I.A.S., LUCAS CARVALHO, L., CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An bras Dermatol** 79 (6): 647-664, 2004.
- MALHEIROS, S.M., OLIVEIRA, A.S., SCHMIDT, B., LIMA, J.G., GABBAI, A.A. Dengue. Muscle biopsy findings in 15 patients. **Arq Neuropsiquiatr.** 51 (2): 159-64, 1993.
- MANSFIELD, K. Marmoset models commonly used in biomedical research. **Comparative Medicine**, V.53, n4, p. 383-392, 2003.
- MARCHETTE, N.J., HALSTEAD, S.B., FALKLER, W.A. JR., STENHOUSE, A., NASH, D. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3.

- Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. **J Infect Dis.** **128** (1): 23-30, 1973.
- MARIANNEAU, P., MÉGRET, F., OLIVIER, R., MORENS, D.M., DEUBEL, V. Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. **J Gen Virol.** **77** (10): 2547-54, 1996.
- MARIANNEAU, P., CARDONA, A., EDELMAN, L., DEUBEL, V., DESPRÈS, P. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. **J Virol.** **71** (4): 3244-9, 1997.
- MARIANNEAU, P., FLAMAND, M., DEUBEL, V., DESPRÈS, P. Induction of programmed cell death (apoptosis) by dengue virus in vitro and in vivo. **Acta Cient Venez.** **49**, 1:13-7, 1998.
- MARTINEZ, E. Fiebre del dengue y dengue hemorrágico em infantes com infecção primaria. **Revista Cubana de Medicina Tropical** **45** (1): 97-102, 1998.
- MARTINEZ, E. **Dengue e dengue hemorrágica**. Buenos Aires: Editorial Universidad nacional de Quilmas, 1998.
- MARTÍN, S.J.L., BRATHWAITE, O., ZAMBRANO, B., SOLÓRZANO, J.O., BOUCKENOGHE, A., DAYAN, G.H., GUZMÁN, M.G. The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. **Am J Trop Med Hyg** **82** (1): 128-135, 2010.
- MARTINS, E.B.G. O fígado e o sistema imunológico. In: GAYOTTO, L.C.C.; ALVES, V.A.F. **Doenças do fígado e vias biliares**. São Paulo, Ateneu, 2001, p. 93-102.
- MARTINS, L. C., DINIZ, J. A. P., SILVA, E. V. P., BARROS, V. L. R. S., MONTEIRO. H. A. O., AZEVEDO, R. S. S., QUARESMA, J. A. S., VASCONCELOS, P. F. C. Characterization of Minaçu virus (Reoviridae: Orbivirus) and pathologic changes in newborn mice experimentally infected. **Intern J Exp Pathol** **88**: 63-73, 2007.
- MILLER GF, BARNARD DE, WOODWARD RA, FLYNN BM, BULTE JW. Hepatic hemosiderosis in common marmosets, *Callithrix jacchus*: effect of diet on incidence and severity. **Lab Anim Sci.** **47**(2):138-42, 1997.
- MITRAKUL, C. Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg.** **25**: 975, 1977.
- MITTERMEIER, R.A., KONSTANT, W.R., MAST, R.B. Use of neotropical and magasy primate species in biomedical research. **Am J Primatol.** **34**: 73-80, 1994.
- MOI, M.L., TAKASAKI, T., OMATSU, T., NAKAMURA, S., KATAKAI, Y., AMI, Y., SUZAKI, Y., SAIJO, M., AKARI, H., KURANE, I. Demonstration of marmosets

- (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viraemia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. **J Gen Virol.** 95 (3): 591-600, 2014.
- MOUNTZ, J.D., ZHOU, T., WU, J., WANG, W., SU, X., CHENG, J. Regulation of apoptosis in immune cells. **J Clin Immunol**15 (1): 1-16,1995.
- MUSTAFA, A.S., ELBISHBISHI, E.A., AGARWAL, R., CHATURVEDI, U.C. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. **Fems Immunol. Med. Microbial.** 30 (3): 229-33, 2001.
- NELSON, M.J. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC, 1986.
- NOGUEIRA, R.M., MIAGOSTOVICH, M.P., LAMPE, E., SOUZA, R.W., ZAGNE, S.M.O., SCHATZMAYR, H.G. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiol Infect** 11: 163–170, 1993.
- NOGUEIRA, R.M., SCHATZMAYR, H.G., DE FILIPPIS, A.M., DOS SANTOS, F.B., DA CUNHA, R.V., COELHO, J.O., DE SOUZA, L.J., GUIMARAES, F.R., DE ARAÚJO, E.S., DE SIMONE, T.S., BARAN, M., TEIXEIRA, G. JR., MIAGOSTOVICH, M.P. Dengue type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis** 11: 1376–138, 2005.
- NOWAK, R.M. **Walker's Mammals of the world.** 5th ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1991. p. 400-514.
- NUNES, M.R.T., FARIA, N.R., VASCONCELOS, H.B., MEDEIROS, D.B.A., DE LIMA, C.P.S., CARVALHO, V.L., DA SILVA, E.V.P., CARDOSO, J.F., SOUSA JR, E.C., NUNES, K.N.B., RODRIGUES, S.G., ABECASIS, A.B., SUCHARD, M.A., LEMEY, P., VASCONCELOS, P.F.C. Phylogeography of Dengue Virus Serotype 4, Brazil, 2010–201. **Emerging Infectious Diseases** 18 (11): 1858-1864, 2012.
- OLIVEIRA, C.A.B., AGUIAR, G.R., BALDANZA, M.S., BARTH, O.M., SILVA, W.A.E., PAES, M.V. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. **Baz J Infect Dis.** 9: 341-347, 2005.
- OMATSU, T., MOI, M.L., HIRAYAMA, T., TAKASAKI, T., NAKAMURA, 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 viraemia and demonstration of protective immunity. **J Gen Virol.** 92 (Pt 10): 2272-80, 2011.

- OMATSU T, MOI ML, TAKASAKI T, NAKAMURA S, KATAKAI Y, TAJIMA S, ITO M, YOSHIDA T, SAITO A, AKARI H, KURANE I. Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. **J Med Primatol.** **41** (5): 289-96, 2012.
- ONLAMOON, N., NOISAKRAN, S., HSIAO, H.M., DUNCAN, A., VILLINGER, F., ANSARI, A.A., PERNG, G.C. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. **Blood.** **115** (9): 1823-34, 2010.
- OSANAI, C.H., TRAVASSOS DA ROSA, A.P., TANG, A.T., DO AMARAL, A.S., PASSOS, A.D., TAUIL, P.L. Outbreak of dengue in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **25**: 53–54, 1983.
- OSANAI, C.H. **A epidemia de dengue em Boa Vista, Território Federal de Roraima, 1981-1982.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Rio de Janeiro, Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, 1984.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). **Dengue y dengue hemorrágico em las Américas: guias para su prevención y control.** Washington: publicación Científica n° 548, 1995.
- PACSA, A.S., AGARWAL, R., ELBISHBISHI EA, CHATURVEDI, U.C., NAGAR, R., MUSTAFA, A.S. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. **Fems Immunol. Med. Microbial.** **28** (2): 151-155, 2000.
- PAGLIARI, C., QUARESMA, J.A., FERNANDES, E.R., STEGUN, F.W., BRASIL, R.A., DE ANDRADE, H.F. JR., BARROS, V., VASCONCELOS, P.F., DUARTE, M.I. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever: contribution to the study of human liver lesions. **Journal of Medical Virology**, **86**: 1193-7, 2014.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue haemorrhagic fever in Venezuela. **Epidemiol Bull** **11**: 7-9, 1990.
- PEREIRA, F.E.L. **Lesões Celulares e do Interstício. Cicatrização. Regeneração.** In: Bogliolo, Patologia Geral. FILHO, G.B. Guanabara, Quarta-edição, Rio de Janeiro, 2009. P. 82-139.
- PEYREFITTE, C.N., PASTORINO, B., GRAU, G.E., LOU, J., TOLOU, H., COUISSINIER-PARIS, P. Dengue virus infection of human microvascular endothelial cells from different vascular beds promotes both common and specific functional changes. *J. Med. Virol.* **78**: 229-242, 2006.
- PINHEIRO, F.P., CORBER, S.J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. **World Health Stat Q** **50**: 161-169, 1997.

- PISSINATTI, A. Manejo, reprodução e utilização biomédico de espécies do gênero *Callithrix* (Erxleben, 1777), Callitrichidae-Primates. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, V. 15, p. 57-61, 1993.
- QUARESMA J.A.S. et al. Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. *Acta Trop* 94: 116-127, 2005.
- QUARESMA, J.A., BARROS, V.L., PAGLIARI, C., FERNANDES, E.R., GUEDES, F., TAKAKURA, C.F., ANDRADE, H.F. JR., VASCONCELOS, P.F., DUARTE, M.I. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF β , TNF α . and NK cells activity. **Virology** 345: 22-30, 2006.
- QUARESMA, J.A., BARROS, V.L., FERNANDES, E.R., PAGLIARI, C., GUEDES, F., VASCONCELOS, P.F.C., DE ANDRADE, JR. H.F., DUARTE, M.I. Immunohistochemical examination of the role of FAS Ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver Yellow fever. *Virus Res* 116: 91-97, 2006.
- QUARESMA, J.A., DUARTE, M.I., VASCONCELOS, P.F.C. Midzonal lesion in the yellow fever: a specific pattern of liver injury caused by direct virus action and by immune anti-inflammatory response. *Med Hypoth* 47: 618-621, 2006.
- QUARESMA JAS et al. Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 101: 161-168, 2007.
- RODA, S.A., PONTES, A.R. Polygyny and infanticide in common marmosets in a fragment of the Atlantic forest of Brazil. **Folia Primatol.** 69 (6): 372-6, 1998.
- ROSEN, L., AYE, M.M., TIN, U. Recovery of virus from the liver of children with fatal dengue: reflections on the pathogenesis of the disease and its possible analogy with that of yellow fever. **Res. Virol.** 140, 351 – 360.
- ROSEN, L., SHROYER, D.A., TESH, R.B., FREIER, J.E., LIEN, J.C. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Am F Trop Med Hyg** 32 (5): 1108-19, 1983.
- ROTHMAN, A.L. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. **Adv Virus Res.** 60: 397-419, 2003.
- ROTHMAN, A.L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **J Clin Invest.** 13: 946-51, 2004.
- ROTHMAN, A.L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and Tropical cytokines storms. **Nat Rev Immunology** 11 (8): 532-43, 2011.

- ROWE, N. **The pictorial Guide to the Living Primates**. East Hampton. Pogonias Press, 1996. 263.
- RYLANDS, A.B. Evolução do sistema de acasalamento em Callitrichidae. In: **Ecologia de animais e de homens**. Ades, C. São Paulo. Edicon, 1986.P. 87-108.
- RYLANDS, A.B., MITTERMEIER, R.A., RODRIGUES-LUNA, E. Conservation of neotropical primates: threatened species and an analysis of primate diversity by country and region. **Folia Primatologia**. **68**: 134-60, 1997.
- SANTOS, N.S.O., ROMANOS, M.T.V., WIGG, M.D. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008. 519p.
- SCHATZMAYR, H.G., NOGUEIRA, R.M., TRAVASSOS DA ROSA, A.P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **81**: 245–246, 1986.
- SCHLESINGER, J.J., BRANDRISS, M.W., CROPP, C.B., MONATH, T.P. Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. **J Virol**. **60** (3): 1153-5, 1986.
- SCHMID, D.S., TITE, J.P., RUDDLE, N.H. DNA fragmentation: manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting helper T-cell clones, and cell-free lymphotoxin-containing supernatant. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **83** (6): 1881-5, 1986.
- SCROFERNEKER, M.L. & POHLMANN, P.R. **Imunologia: Básica e Aplicada**. Porto Alegre, Sagra Luzzatto, 1998. 571p.
- SERUFO, J.C., DE OCA, H.M., TAVARES, V.A., SOUZA, A.M., ROSA, R.V., JAMAL, M.C., LEMOS, J.R., OLIVEIRA, M.A., NOGUEIRA, R.M., SCHATZMAYR, H.G. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **88** (3): 503-504, 1993.
- SHAFEE, N. BAKAR, S.A. Induction of apoptosis by dengue 2 (New Guinea strain) virus infection in vitro. **Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol**. **5** (2): 111-117, 1997.
- SHU PY et al. Development of group and serotype specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol* **41**: 2408-2416, 2003.
- SILVA, L.J. & ANGERAMI, R.N. Dengue. In: **Infectologia Pediátrica**. Farhat, C.K. (3ª eds). São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, Editora Atheneu, 2007. P. 533-551.

- SILVA JUNIOR, J.B. & PIMENTA JUNIOR, F.G. Epidemiologia da Dengue. In: **Dengue - Diagnóstico, Tratamento e Prevenção**. Souza, L.J. (2ª eds). Rio de Janeiro, Editora Rubio Ltda, 2008. P. 11-35.
- SIQUEIRA, J.B. JR., MARTELLI, C.M., COELHO, G.E., SIMPLICIO, A.C., HATCH, D.L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg Infect Dis** **11** (1): 48-53, 2005.
- SOUZA, L.J. **Dengue: Diagnóstico, Tratamento e Prevenção**. Rio de Janeiro, Rubio, 2008. 247p.
- TAN, G.K., NG, J.K., 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**. **4** (4): e672, 2010.
- TEIXEIRA, M.G., BARRETO, M.L., COSTA, M.C.N., FERREIRA, L.D.A. VASCONCELOS, P.F.C. Dinâmica de circulação do vírus da dengue em uma área metropolitana do Brasil. **Epidemiol Serv Saúde** **12** (2) :87-97, 2003.
- TEIXEIRA, M.G., BARRETO, M.L., COSTA, M.C.N., FERREIRA, L.D.A. MOATO, V. Exposure to the risk of dengue virus infection in an urban setting: ecological versus individual heterogeneity. **Dengue Bull** **31**: 36-46, 2007.
- 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** **17** (5): 938-940, 2011.
- TEOH, B.T., SAM, S.S., ABD-JAMIL, J., ABUBAKAR, S. Isolation of ancestral sylvatic dengue virus type 1, Malaysia. **Emerg Infect Dis**. **16**(11):1783-5, 2010.
- TESH, R.B., GUZMAN, H., DA ROSA, A.P., VASCONCELOS, P.F., DIAS, L.B., BUNNELL, J.E., ZHANG, H., XIAO, S.Y. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. **J Infect Dis** **183**: 1431-1436, 2001.
- THEIN, S., AUNG, M.M., SHWE, T.N., AYE, M., ZAW, A., AYE, K., AYE, K.M., AASKOV, J. Risk factors in dengue shock syndrome. **Am J Trop Med Hyg** **56**: 566-572, 1997.
- THOISY, B., LACOSTE, V., GERMAIN, A., MUÑOZ-JORDÁN, J., COLÓN, C., MAUFFREY, J.F., DELAVAL, M., CATZEFLIS, F., KAZANJI, M., MATHEUS, S., DUSSAR, T.P., MORVAN, J., SETIÉN, A.A., DEPARIS, X., LAVERGNE, A. Dengue Infection in Neotropical Forest Mammals. **Vector Borne Zoonotic Dis**. **9** (2): 157-170, 2009.
- TORRES, E.M. **Dengue**. Rio de Janeiro, Fiocruz, 2005. 344p.

- TRISTÃO SÁ, R. & ZAGNE, S.M.O. Classificação da Dengue. In: **Dengue: Diagnóstico, Tratamento e Prevenção**. Souza, L.J. (2ª eds). Rio de Janeiro, Editora Rubio Ltda, 2008. P. 67-74.
- VASCONCELOS, P.F.C., AZEVEDO, R.S.S, RODRIGUES, S.G., MARTINS, L.C., CHIANG, J.O., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. Arboviroses. In: **Medicina tropical e Infectologia na Amazônia**. Leão, R.N.Q. (eds). Belém, Samauma Editorial, 2013. P. 481-502.
- VASCONCELOS, P.F.C., DE MENEZES, D.B., MELO, L.P., PESSOA, P., RODRIGUES, S.G., TRAVASSOS DA ROSA, E., TIMBÓ, M.J., COELHO, C.B., MONTENEGRO, F., TRAVASSOS DA ROSA, J., ANDRADE, F., TRAVASSOS DA ROSA. A. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **37**: 253–255, 1995.
- VASCONCELOS, P.F.C., RODRIGUES, S.G., OLIVEIRA, C.S., AZEVEDO, R.S.S., CRUZ, A.C.R. & NUNES, M.R.T. Dengue. In: **Medicina tropical e Infectologia na Amazônia**. Leão, R.N.Q. (eds). Belém, Samauma Editorial, 2013. P. 511-530.
- VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., PINHEIRO, F.P., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Arboviroses. In: **Tratado de Infectologia**. Focaccia, R. & Veronesi, R. (Ed.) v. 1, São Paulo, Atheneu, 2005. P. 289-302.
- VASCONCELOS, P.F.C. et al. Aedes aegypti, dengue and re-urbanization of yellow fever in Brazil and other South American Countries. Past and present, and future perspectives. **WHO Dengue Bull** 23: 55-66, 1999.
- VASCONCELOS PFC et al. An epidemic of sylvatic yellow fever in Southeast region of Maranhão State, Brazil, 1993-1994. Epidemiological and entomological findings. **Am J Trop Med Hyg** 57: 132-137, 1997.
- VIEIRA, W.T.; GAYOTTO, L.C.; DE LIMA, C.P.; DE BRITO, T. Histopathology of the human liver in yellow fever with special emphasis on the diagnostic role of the Councilman body. **Histopathol.** p.195-208, 1983.
- WHITEHEAD, S.S., BLANEY, J.E., DURBIN, A.P., MURPHY, B.R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Microbiol Rev** **5** (7): 518-528, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue and severe dengue. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 01/11/2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control -- New edition**. WHO - Geneva. 2009.

XIAO, S.Y., ZHANG, H., GUZMAN, H., TESH, R.B. Experimental yellow fever virus infection in Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. **J Infect Dis** **183**: 1437-1444, 2001.

XIAO SY et al. Alteration of clinical outcome and histopathology of yellow fever virus infection in a hamster model by previous infection with heterologous flaviviruses. *Am J Trop Med Hyg* **68**: 695-703, 2003.

YAMAMOTO, M.E. Comportamento social do gênero *Callithrix* em cativeiro. In: **A primatologia no Brasil – 3**. Raylands, A.B., Bernardes, A.T. Fundação Biodiversidades. 1991, P. 63-81.

YAUCH, L.E., SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease. **Antiviral Res** **80**: 87-93, 2008.

ZOMPI, S., HARRIS, E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses*. **4** (1): 62-82, 2012.

Apêndice A - Faixa Etária Dos Animais Selecionados Para Cinética Experimental

Infecção Primária VDEN-3			
Primata (espécie)	Coleta espécimes biológicos	Sexo	Faixa etária
<i>Callithrix penicillata</i>	1º d.p.i. primária	F	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	2º d.p.i. primária	M	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	3º d.p.i. primária	F	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	4º d.p.i. primária	M	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	5º d.p.i. primária	M	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	6º d.p.i. primária	M	Idoso
<i>Callithrix penicillata</i>	7º d.p.i. primária	M	Idoso
<i>Callithrix penicillata</i>	15º d.p.i. primária	F	Jovem
<i>Callithrix penicillata</i>	20º d.p.i. primária	M	Jovem
<i>Callithrix penicillata</i>	30º d.p.i. primária	M	Jovem
<i>Callithrix penicillata</i>	45º d.p.i. primária	F	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	60º d.p.i. primária	M	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	Controle	M	Adulto
Infecção Secundária VDEN-2			
Primata (espécie)	Coleta espécimes biológicos	Sexo	Faixa etária
<i>Callithrix penicillata</i>	1º d.p.i. secundária	M	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	2º d.p.i. secundária	M	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	3º d.p.i. secundária	F	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	4º d.p.i. secundária	M	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	5º d.p.i. secundária	M	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	6º d.p.i. secundária	M	Idoso
<i>Callithrix penicillata</i>	7º d.p.i. secundária	M	Idoso
<i>Callithrix penicillata</i>	15º d.p.i. secundária	F	Jovem
<i>Callithrix penicillata</i>	20º d.p.i. secundária	F	Jovem
<i>Callithrix penicillata</i>	30º d.p.i. secundária	M	Jovem
<i>Callithrix penicillata</i>	45º d.p.i. secundária	M	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	60º d.p.i. secundária	M	Adulto
<i>Callithrix penicillata</i>	Controle	M	Adulto

Apêndice B – Avaliação histopatológica semiquantitativa[#] da infecção primária

dia pós inoculação	Ácinos																				Espaço porta			
	Esteatose			Tumefação			Inflamação			Tipos celulares*			apoptose hepatócitos	Kupffer hiperplasia hipertrofia	Necrose hepatócito			Hemossideri na kupffer			Inflamação VHC	Inflamação	Tipos celulares*	
	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3	escore	escore	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3				
1	0	0	0	2	3	3	0	1	1	0	1,3,4,5	1,5	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1,3,5
2	0	0	0	2	3	3	0	1	1	0	1,4,5	1	2	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	
3	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1,3,5	1,5	1	3	0	1	0	0	3	3	1	1	1,3,5	
4	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1,5	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1,2,5	
5	0	0	0	3	3	3	0	1	1	0	1,4,5	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1,5	
6	0	0	0	3	3	3	0	1	1	0	1,5	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	
7	0	0	0	2	3	3	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
15	0	0	0	2	3	3	0	1	1	0	1,5	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
20	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
45	0	0	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
60	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1,5	1	0	3	0	1	0	0	2	0	1	0	0	
Sentinela 1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

#: 0 = considerado padrão de histologia normal ou ausência da lesão; 1 = lesão discreta; 2 = moderada e 3 = marcante.

* 1 = linfócitos; 2 = plasmócitos; 3 = neutrófilos/eosinófilos; 4 = megacariócitos; 5 = macrófagos.

Apêndice C – Avaliação histopatológica semiquantitativa[#] da infecção secundária

dia pós inoculação	Ácinos																				Espaço porta				
	Esteatose			Tumefação			Inflamação			Tipos celulares*			apoptose hepatócitos	Kupffer hiperplasia hipertrofia	Necrose hepatócitos			Hemossiderina kupffer			Inflamação VHC	Inflamação	Tipos celulares*		
	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3	escore	escore	Z1	Z2	Z3	Z1	Z2	Z3					
1	0	0	0	2	3	3	0	1	0	0	1,5	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1,5	0	0	3	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	2	1	0	1	1	0	1,5	1	0	2	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
4	0	0	0	2	3	3	0	1	1	0	1,3	1,3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	1,2,3,5		
5	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	3	3	3	0	1	0	0	1,5	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	3	3	3	0	1	1	0	1,5	1,5	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
15	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	1	2	2	0	1	0	0	1,3,5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	1	2	2	0	1	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
60	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1,5	1,5	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Sentinelas 2	0	0	0	2	3	3	0	1	0	0	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

#: 0 = considerado padrão de histologia normal ou ausência da lesão; 1 = lesão discreta; 2 = moderada e 3 = marcante.

* 1 = linfócitos; 2 = plasmócitos; 3 = neutrófilos/eosinófilos; 4 = megacariócitos; 5 = macrófagos.

Apêndice D - Diagnóstico Morfológico das Alterações Hepáticas

PNH	Diagnóstico Morfológico das Alterações Hepáticas
Dia pós inoculação	Infecção Primária
1	discreta hepatite lobular linfocítica com dilatação de sinusoides, poucos hepatocitos em apoptose e necrose, balonização hepatocelular moderada difusa. Sem colestase, com hiperplasia de kupffer e sem hemossiderina.
2	discreta hepatite lobular linfocítica com hepatócitos em apoptose e necrose multifocal e balonização difusa moderada. Sem colestase, discreta hiperplasia de kupffer, sem hemossiderose e raros megacariócitos nos sinusoides, dilatação de sinusoides em z2 e z3.
3	discreta hepatite portal e lobular multifocal com apoptose e necrose de hepatócitos multifocal, discreta balonização em z3, hiperplasia de kupffer, infiltrado de linfócitos em VHC e hemossiderose tanto em hepatocitos discreta e moderada em kupffer. Sem colestase, e fibrose. discreta lipidose hepatocelular em z2.
4	discreta hepatite portal e com focos discretos de atividade lobular linfocítica com hepatócitos em apoptose e necrose, discreta hiperplasia de kupffer. discreta balonização em hepaocitos de z2 e z3. Sem colestase, e sem hemossiderina ou fibrose. sinuosiudes discretamente dilatados em Z2 e Z3
5	discreta hepatite lobular e portal multifocal linfocítica com poucos hepatócitos em apoptose e necrose em Z2, marcante balonização hepatocelular difusa, discreta hiperplasia de kupffer com discreta hemossiderina. Sem colestase, fibrose.
6	discreta hepatite lobular linfocítica multifocal com focos de apoptose e necrose de hepatócitos , marcante balonização hepatocelular difusa discreta hemossiderina em kupffer e VHC. Sem colestase fibrose.
7	discreta hepatite lobular linfocítica multifocal, ausência de apoptose discreto infiltrado de linfócitos ao redor da VHC multifocal. Ausência de hiperplasia de kupffer, hemossiderina e fibrose.
15	discreta hepatite lobular linfocítica multifocal com poucos focos de necrose em hepatócitos e infiltrado de linfócitos na parede de VHC multifocal.moderada balonização de hepáticos difusa. Sem hiperplasia e sem hemossiderina e fibrose.
20	tumefação/ balonização hepatocelular difusa moderada e hiperplasia de kupffer.
30	discreta tumefação hepatocelular em Z3.
45	discreta hepatite linfocítica portal multifocal e balonização hepatocelular difusa moderada.
60	moderada hepatite lobular linfocítica multifocal em z2 com necrose de hepatócitos, hiperplasia de kupffer com hemossiderina.discreta lipidose hepatocelular em z2 e discreta balonização hepatocelular z2 e z3.
Sentinela 1	discreta balonização hepatocelular com dilatação de sinusoides em Z2 e Z3.

Apêndice E – Diagnóstico Morfológico das Alterações Hepáticas

PNH	Diagnóstico Morfológico das Alterações Hepáticas
Dia pós inoculação	Infecção Secundária
1	discreta hepatite lobular linfocítica sem apoptose de hepatócitos com discreta necrose, moderada balonização hepatocelular difusa
2	discreta hepatite lobular linfocítica multifocal com necrose hepatocelular multifocal, hiperplasia de kupffer e hemossiderina. Discreta balonização hepatocelular em z2. Discreta esteatose em z2
3	discreta hepatite lobular e portal linfocítica multifocal, com necrose hepatocelular multifocal, com linfócitos ao redor de VHC, hiperplasia de kupffer e discreta hemossiderina em kupffer. Discreta balonização hepatocelular em z 2
4	discreta hepatite lobular linfocítica e moderada portal linfocítica. Focos de necrose de hepatócitos z2.
5	discreta hepatite lobular linfocítica com balonização moderada Z2 e Z3. dilatação de sinusoides e de linfáticos portais. Necrose de hepatócitos multifocais.
6	discreta hepatite lobular linfocítica multifocal com necrose hepatocelular, hiperplasia de kupffer e discreta hemossiderina em kupffer. Marcante balonização hepatocelular difusa.
7	discreta hepatite lobular linfocítica multifocal com necrose de hepatócitos e discreta hemossiderina em kupffer.
15	discreta balonização hepatocelular em z3 com discreta dilatação sinusoidal. Discreta esteatose microgoticular em z 3 multifocal.
20	moderada balonização hepatocelular difusa e discreta dilatação sinusoidal em z2 e z3.
30	discreta hepatite lobular linfocítica multifocal com discreta necrose, moderada balonização hepatocelular difusa.
45	discreta hepatite lobular linfocítica multifocal e hepatite portal linfocítica multifocal. Moderada balonização em z2 e z3. Ausência de hepatócitos em apoptose.
60	discreta hepatite lobular multifocal linfocítica, discreta balonização hepatocelular em z 2 e z3 e discreta hepatite portal linfocítica multifocal. Sem hemossiderina e sem apoptose.
Sentinela 2	moderada a intensa balonização hepatocelular.