

CAPÍTULO 8

EFEITO IMUNOESTIMULADOR DO VÍRUS DENGUE (DENV-1) EM CAMUNDONGOS PELA VIA INTRANASAL

Marlos Gomes Martins
Carlos Henrique Araujo Dias

RESUMO

Estudos juntam esforços para produzir uma vacina contra dengue capaz de estimular a produção de anticorpos específicos contra os cinco vírus que causam a doença, porém, uma das grandes dificuldades é conhecer o comportamento imunológico de cada vírus. Assim, este estudo objetivou conhecer o comportamento imunológico do sorotipo dengue-1 administrado via intranasal em camundongos. Para avaliar o efeito imunoestimulatório do vírus dengue, grupos de camundongos (n=16) foram imunizados com 10 µg de vírus e solução salina 0,85% (grupo controle) por via intranasal, durante 15 dias consecutivos. A resposta imunológica da mucosa e sistêmica foi avaliada pela proliferação celular das placas de Peyer e pela quantificação de anticorpos específicos por ELISA dos camundongos imunizados. O vírus dengue-1 foi capaz de estimular a via de mucosa mesmo sendo uma via exótica para este patógeno. Portanto, o vírus dengue apresentou atividade imunogênica significativa local e sistêmica em camundongos quando em contato com a via intranasal.

PALAVRAS-CHAVE: Dengue. Administração intranasal. Mucosa. Anticorpos.

INTRODUÇÃO

A dengue é hoje uma das mais importantes arboviroses que causam infecções em humanos e constitui um sério problema de saúde pública no mundo, especialmente em países de clima tropical, onde existem condições favoráveis para o desenvolvimento e proliferação dos mosquitos vetores. O vírus dengue (DENV) apresenta-se como cinco sorotipos (DENV 1-5) antigenicamente distintos, porém, sorologicamente relacionados (BEASLEY; BARRET, 2008; MUSTAFA et al., 2015).

A doença se apresenta desde a forma assintomática até formas mais graves, como a febre hemorrágica do dengue (FHD) e a síndrome do choque do dengue (SCD), ambas mostrando significativas taxas de mortalidade (GUZMAN; KOURI, 2001). A gravidade da doença está associada ao sorotipo envolvido e, significativamente, aos fatores genéticos e imunológicos (Henchal; Puntnak, 1990; Mongkolsapaya, 2003; Navarro-Sánchez; Desprès; Cedillo-Barrón, 2005). Aproximadamente 100 milhões de casos novos são confirmados anualmente para a doença em todo o mundo, sendo 500 mil de suas formas graves (WHO, 2017).

Apesar do Brasil ter registrado uma vacina contra a dengue em 2015, do tipo atenuada,

a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ainda não recomenda a sua utilização por pessoas sem exposição prévia ao vírus, devido aos riscos de desenvolvimento da doença, inclusive nas formas graves (PAULA, 2019). Além disso, a vacina é contraindicada para pessoas com a imunidade reduzida, gestantes, crianças e recém-nascidos.

Este fator, somado à inexistência de drogas específicas para o tratamento da dengue, faz com que a identificação precoce se torne fundamental para redução dos riscos, estando as medidas de controle dessa doença concentradas na eliminação do mosquito vetor (GUZMAN; KOURI, 2001; HALSTEAD, 2007; SINGHI; KISSOON; BANSAL, 2007; KYLE; HARRIS, 2008). Desta forma, a Organização Mundial de Saúde tem priorizado o desenvolvimento de vacinas efetivas contra a dengue, configurando um grande desafio para a comunidade científica (WHITEHEAD, 2007).

Alguns estudos obtiveram sucesso com o estímulo da imunidade de mucosa utilizando microrganismos que não fazem parte da microbiota normal e que não possuem nenhuma capacidade patogênica para o indivíduo, sendo capazes de levar a um estímulo imunogênico protetor a nível sistêmico (GILBERT et al., 2000; XIN et al., 2003; BESERRA-JUNIOR et al., 2003; BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2004; MOORTHY; RAMASAMY, 2007). A rota de mucosa é considerada vantajosa quando comparada a rota parenteral, por ser menos invasiva e uma rota natural para vários tipos de microrganismos (HOLMGREN et al., 2007).

Seja para diagnóstico ou meio de administração de vacinas, o uso de métodos não invasivos para dengue é considerado importante para estudos clínicos e epidemiológicos (CUZZUBBO et al., 1998). Assim, este estudo investiga a reação do sistema imune ao vírus dengue 1 quando estimulado através da mucosa nasal e suas consequências locais e sistêmicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígeno viral

O vírus dengue sorotipo 1 (DENV-1) foi fornecido pelo laboratório de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas, Brasil. O material liofilizado inativado foi reconstituído em água destilada estéril e estocado a -20°C . A concentração viral foi ajustada pelo método de Bradford (1976) em $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$. A solução foi mantida em recipiente estéril a -20°C .

Animais

Foram utilizados 36 camundongos *Swiss* fêmeas, com oito semanas de idade, originados do biotério da Universidade Federal do Ceará, Brasil. Estes foram divididos em dois grupos, de

forma a constituir um grupo teste e um grupo controle. Todos os animais foram providos de água e alimento *ad libitum*. Todo o experimento foi conduzido sob as regras do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Ceará (UECE), registrado sob o número 2244341/2014.

Imunização

Os camundongos foram imunizados com 10 microlitros de antígeno (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), em cada aplicação, com o auxílio de uma micropipeta (BESERRA-JUNIOR et al., 2003). Sendo introduzidos em cada narina 5 microlitros da suspensão viral. O grupo controle recebeu solução salina 0,85%. O período de imunização decorreu por 15 dias com um desafio antigênico administrado ao 35º dia após o início das imunizações.

Obtenção de soro

Os antissoros foram obtidos nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 a contar do início das imunizações por punção do plexo retro orbital dos camundongos. Os antissoros foram armazenados a -20 °C até o momento do uso.

Extração e contagem das placas de Peyer

Nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42, após o término da imunização, camundongos (n=6) foram sacrificados e três placas de Peyer foram cuidadosamente removidas e maceradas em 1 mL de NaCl 0,15M com 5% de soro bovino fetal. Esse homogenato foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 3 mL de NaCl 0,15M e novamente centrifugado. Foram retirados 50 μL do homogenato das placas de Peyer para coloração com 450 μL do corante de Turk. Uma alíquota de 50 μL foi analisada em câmara de Neubauer para contagem do número de células. O valor de cada contagem foi multiplicado por um fator de 10^5 para obtenção do valor total de leucócitos por mL, que foi utilizado para o cálculo de regressão linear. O coeficiente de correlação e os erros padrões das médias dos leucócitos também foram calculados.

ELISA

A determinação do teor de anticorpos específicos foi quantificada pelo método de ELISA (FLORINDO et al., 2002). Inicialmente, as microplacas foram sensibilizadas com o antígeno vírus dengue, 20 μg por poço. A placa foi bloqueada com PBS-leite 5% a 4°C overnight. As placas então foram incubadas com o soro dos camundongos em gradientes de diluição (1:10-1:1280) e, posteriormente, com IgG1 e IgA (antimouse) conjugadas a

peroxidase. O cutoff foi calculado com a média+3x o desvio padrão da absorbância determinado por ELISA.

Análise estatística

Para todos os dados analisados se utilizou o software Origin Microcall 7.0. Determinou-se a média \pm desvio padrão para os testes sorológicos e para a contagem de células. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Avaliação da resposta imune celular

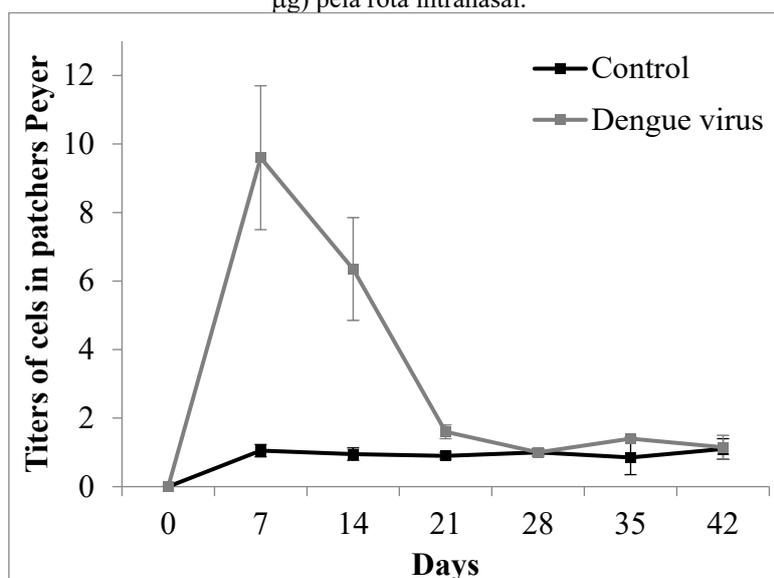
Os resultados obtidos para as análises das placas de Peyer mostraram que houve um aumento significativo do número de leucócitos no tecido linfoide. As placas de Peyer fazem parte do tecido linfoide associado à mucosa e possui um papel significativo no controle de infecções na mucosa intestinal. Segundo Xu-Amano *et al.* (1992) são os maiores sítios de síntese de IgA em mamíferos.

A cinética de multiplicação celular mostrou um pico no 7º dia. Nos dias seguintes, os títulos começaram a baixar e no 21º dia se tornaram similares ao grupo controle, mantendo-se assim até o final do experimento, mesmo após o desafio antigênico dado no 35º dia (Fig. 1).

Avaliação da resposta imune humoral

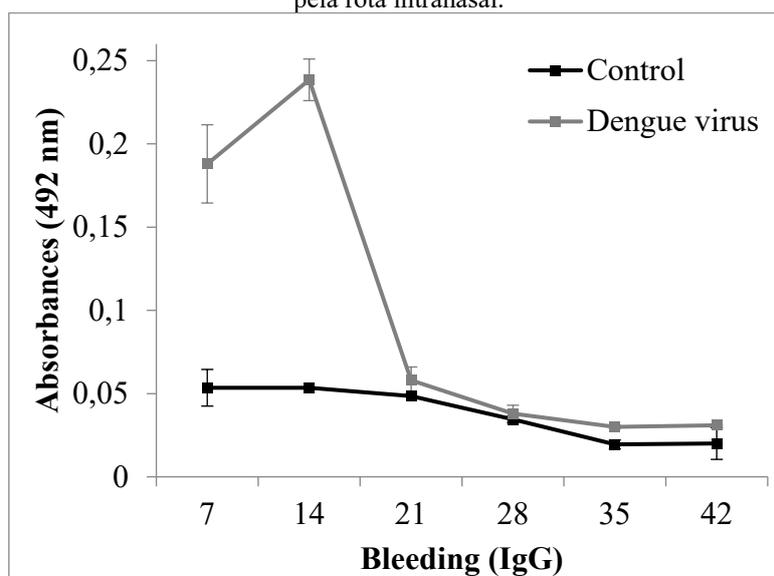
O desenvolvimento de uma resposta protetora contra o DENV-1, em níveis sistêmicos, foi verificado através da produção de anticorpos imune específicos em níveis séricos. Os títulos da IgG aumentaram, significativamente, entre os dias 7 e 14, após o início das imunizações. No 21º dia os títulos de anticorpos diminuíram e mantiveram-se baixos até o final do experimento. Mesmo após o desafio antigênico (35º dia) não foi observado uma resposta imune secundária clássica (Fig. 2).

Figura 1: Proliferação de leucócitos em placas de Peyer após imunização com o vírus dengue sorotipo 1 (~10 µg) pela rota intranasal.



Fonte: Próprio autor, 2022.

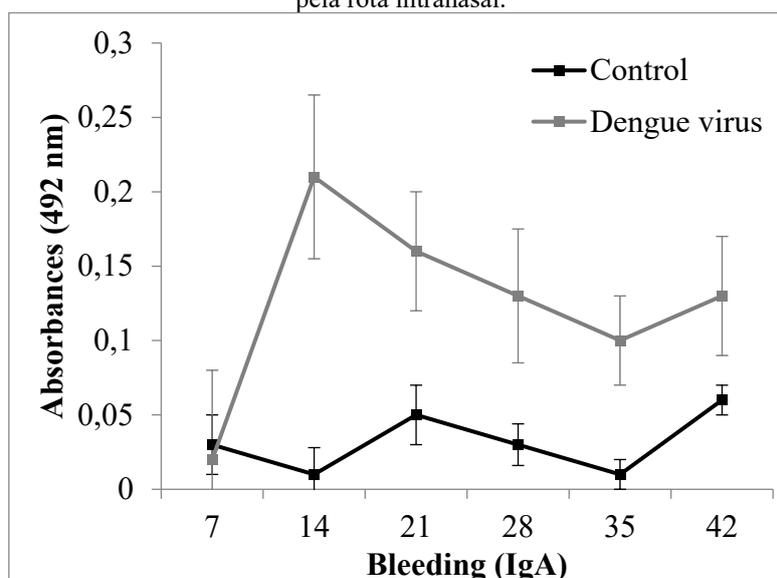
Figura 2: IgG encontrada em soro de camundongo após imunização com o vírus dengue sorotipo 1 (~10 µg) pela rota intranasal.



Fonte: Próprio autor, 2022.

A IgA é característica da imunidade de mucosa e sua presença é indicativa da sensibilização e ativação da resposta imune neste compartimento. A presença de IgA foi detectada por ELISA em soros de camundongos imunizados com DENV-1. Os títulos de anticorpos iniciaram no 7º dia após o início das imunizações e aumentaram até o 14º dia, quando apresentou seu pico. A partir desse ponto a concentração de anticorpos diminuiu até o 35º dia (Fig. 3). Após o desafio antigênico (35º dia) os títulos subiram levemente.

Figura 3: IgA encontrada em soro de camundongo após imunização com o vírus dengue sorotipo 1 (~10 µg) pela rota intranasal.



Fonte: Próprio autor, 2022.

DISCUSSÃO

Estudos mostram que a partícula viral do dengue ou a proteína viral, mesmo sem auxílio de adjuvantes, pode induzir uma atividade imunogênica pela via parenteral (ZHANG et al., 2007; AMORIM et al., 2010). Este estudo, por sua vez, mostra que DENV-1 ativa uma resposta imune de mucosa por via intranasal. O aumento no número de células nas placas de Peyer sugere o processo de expansão clonal dos linfócitos T e B. Normalmente, em um camundongo adulto, 50 a 70% do tecido linfoide são formados por células B e entre 10 e 30% formados por células T, sendo um forte mediador da resposta imune (HASHIMOTO et al., 2001).

A imunidade de mucosa é dificilmente estimulada por conta de inibir o desenvolvimento de uma resposta imune desnecessária. Fato verificado por estar constantemente em contato com o meio externo e seus antígenos. Estudos mostram que a via intranasal induz uma resposta imune muitas vezes superior ao estímulo pela via oral, devido ausência de contato com enzimas do trato digestivo e a necessidade de pequenas quantidades de antígenos (ABRAHAN, 1992; BRENNAN et al., 1999; BESERRA-JUNIOR et al., 2003). Tal afirmação corrobora com o estímulo imunogênico induzido pelo DENV-1 pela via intranasal.

Após o 14º dia de experimento ocorreu uma diminuição no número de células nas placas de Peyer, podendo ser explicado por: (1) a migração de células ativas para a lâmina própria, promovendo a eliminação de antígenos no sítio de estimulação e, para os linfonodos proximais, de onde podem migrar até a corrente sanguínea e causar um estímulo sistêmico contra o vírus, levando assim a ativação linfocitária e a produção de IgG (ROTHKÖTTER; PABST; BAILEY,

1999; HALEY, 2003); (2) o número de linfócitos diminuiu após o longo período de exposição ao antígeno induzindo tolerância, um estado de anergia onde o sistema imunológico tende a tolerar um antígeno. É possível que os eventos citados tenham ocorrido simultaneamente, tendo em vista o aumento dos títulos de IgG até a segunda semana, demonstrando a migração celular até a corrente sanguínea e logo após o início da resposta imune local de mucosa observa-se uma pequena diminuição dos títulos.

A capacidade da resposta imune de mucosa em estimular tanto uma imunidade local quanto sistêmica é conhecida na literatura (HOLMGREN et al., 2003; BRANDZAEG, 2007), mesmo que o estado tolerogênico tenha se instalado. Foi observado um estado de responsividade imunogênica nas primeiras semanas do experimento. A atividade sistêmica humoral desencadeada por estímulos imunogênicos pelas vias intranasal e oral com imunógenos não patogênicos e não comuns a microbiota das mucosas foi descrita em outros ensaios (BESERRA-JUNIOR et al., 2003; MOORTHY; RAMASAMY, 2007).

Neste estudo uma resposta imune sérica foi obtida em camundongos imunizados pela rota intranasal com DENV-1, com síntese de anticorpos imune específicos contra as partículas virais. O DENV é muito patogênico, no entanto, inofensivo pela rota de mucosa e, mesmo assim foi capaz de estimular uma resposta imunogênica protetora por esta via.

Embora estudos demonstrem que a estimulação da imunidade de mucosa se restringe a proteger infecções que invadem o organismo por esta via (BRANDZAEG, 2007), como as infecções respiratórias, é necessário considerar a forma de infecção do DENV. O vírus invade células inflamatórias como células dendríticas e macrófagos, os quais são comuns a vários tipos de tecidos, incluindo a mucosa (TASSANEETRITHEP et al., 2003; LOZACH et al., 2005; MILER et al., 2008). Já tendo sido encontrado DENV nos macrófagos alveolares (JESSIE et al., 2004).

A atividade imunogênica, de mucosa e sistêmica, foi observada neste trabalho, no entanto, o caráter local mostrou-se mais pronunciado. Mesmo com a redução considerável das taxas de IgG os títulos de IgA imune específicas mantiveram-se elevadas, exibindo uma resposta imune secundária. O que demonstra que a imunidade de mucosa se comporta de forma independente, com a formação de uma memória imunológica contra os estímulos locais.

Brandzaeg (2007) mostrou que mesmo com o desenvolvimento de tolerância periférica pode ser desenvolvida uma memória imunológica de mucosa duradoura, resultante da migração de células linfocitárias, previamente ativadas, para locais próximos à mucosa. Esse

comportamento propicia a utilização desta via em diagnósticos, tais como, a detecção de anticorpos na saliva (OLIVEIRA et al., 1999). A IgA tem se mostrado ser um potencial marcador de casos graves da dengue em infecções secundárias. Os títulos de IgA são mais elevados em estágios anteriores ao aparecimento de títulos de IgM e IgG em estudos com FHD (BALMASEDA et al., 2003; MATHEUS et al., 2009).

Os resultados evidenciam uma tolerância em uma fase mais tardia, percebida quando ocorreu a redução de títulos de linfócitos e de anticorpos simultaneamente. Isto sugere que os mediadores de tolerância atuaram em uma via sistêmica. Provavelmente, o tempo de exposição (HOLMGREN et al., 2003), uma boa sensibilidade da via imunogênica (BESERRA-JUNIOR et al., 2003) e a imunogenicidade do vírus (KANESA-THASAN et al., 2001) foram determinantes para estimular a tolerância. Contudo, deve ser considerado que foi necessária uma quantidade mínima do imunógeno para induzir a atividade imunológica.

CONCLUSÃO

O DENV-1 foi capaz de estimular a via de mucosa e a síntese de anticorpos imune específicos em camundongos sem a utilização de qualquer adjuvante, entretanto, provou ser, em parte, um ativador de anergia do sistema imune. A via intranasal é menos invasiva, de fácil administração e de baixo risco, abrindo-se, portanto, novas possibilidades para estudos que objetivam ações vacinais protetoras.

REFERÊNCIAS:

ABRAHAM, E. Intranasal immunization with bacterial polysaccharide containing liposomes enhances antigen-specific pulmonary secretory antibody response. **Vaccine**, v. 10, n. 7, p. 461-468, 1992.

AMORIM, J. H.; PORCHIA, B. F.; BALAN, A.; CAVALCANTE, R. C.; COSTA, S. M.; ALVES, A. M. B.; FERREIRA, L. C. S. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal of virological methods**, v. 167, n. 2, p. 186-192, 2010.

BALMASEDA, A.; GUZMÁN, M. G.; HAMMOND, S.; ROBLETO, G.; FLORES, C.; TÉLLEZ, Y.; Harris, E. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, n. 2, p. 317-322, 2003.

BEASLEY, D. W. C.; BARRET, A. D. T. The Infection Agent. Dalam: Halstead SB. Dengue. 2008.

- BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; CORTES-PEREZ, N. G.; LE LOIR, Y.; ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M.; TAMEZ-GUERRA, R. S.; OCA-LUNA, R. M.; LANGELLA, P. An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. **Journal of medical microbiology**, v. 53, n. 5, p. 427-433, 2004.
- BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; FLORINDO, M. I.; ARAGÃO, M. E. F. D.; MARTINS, M. G.; MARTINS, V.; LIMA, M. D. G. S. Resposta imune humoral de camundongos imunizados pelas vias oral e nasal com papaya lethal yellowing virus. **Ciência Animal**, v. 13, p. 17-22, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRANDTZAEG, Per. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5467-5484, 2007.
- BRENNAN, F. R.; BELLABY, T.; HELLIWELL, S. M.; JONES, T. D.; KAMSTRUP, S.; DALSGAARD, K.; HAMILTON, W. D. Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune responses in mice. **Journal of virology**, v. 73, n. 2, p. 930-938, 1999.
- CUZZUBBO, A. J.; VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; SUNTAYAKORN, S.; AASKOV, J.; DEVINE, P. L. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3737-3739, 1998.
- FLORINDO, M. I.; ARAGÃO, M. E. F.; SILVA, A. C. M.; OTOCH, M. L.; MELO, D.; LIMA, J. A. A.; LIMA, M. G. Immune response induced in mice oral immunization with cowpea severe mosaic virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 827-835, 2002.
- GILBERT, C.; ROBINSON, K.; LE PAGE, R. W.; & WELLS, J. M. Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3251-3260, 2000.
- GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.
- HALEY, P. J. Species differences in the structure and function of the immune system. **Toxicology**, v. 188, n. 1, p. 49-71, 2003.
- HALSTEAD, S. B. Dengue. **The lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.
- HASHIMOTO, A.; YAMADA, H.; MATSUZAKI, G.; NOMOTO, K. Successful priming and tolerization of T cells to orally administered antigens in B-cell-deficient mice. **Cellular immunology**, v. 207, n. 1, p. 36-40, 2001.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C.; ERIKSSON, K.; & MHARANDI, A. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. **Vaccine**, v. 21, p. S89-S95, 2003.

JESSIE, K.; FONG, M. Y.; DEVI, S.; LAM, S. K.; WONG, K. T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411-1418, 2004.

KANESA-THASAN, N.; SUN, W.; KIM-AHN, G.; VAN ALBERT, S.; PUTNAK, J. R.; KING, A.; HOKE JR, C. H. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. **Vaccine**, v. 19, n. 23-24, p. 3179-3188, 2001.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annu. Rev. Microbiol.**; v. 62, p. 71-92, 2008.

LOZACH, P. Y.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SANCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J. L.; AMARA, A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23698-23708, 2005.

MATHEUS, S.; LACOSTE, V.; LABEAU, B.; MOUA, D.; BREMAND, L.; BINH, P.; DEPARIS, X. Techniques de routine et approches innovantes pour le diagnostic biologique de la dengue. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 2009, n. 417, p. 49-57, 2009.

MILLER, J. L.; WET, B. J. M.; MARTINEZ-POMARES, L.; RADCLIFFE, C. M.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M.; GORDON, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. e17, 2008.

MONGKOLSAPAYA, J.; DEJNIRATTISAI, W.; XU, X. N.; VASANAWATHANA, S.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; CHAIRUNSRI, A.; SCREATON, G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.

MOORTHY, G.; RAMASAMY, R. Mucosal immunisation of mice with malaria protein on lactic acid bacterial cell walls. **Vaccine**, v. 25, n. 18, p. 3636-3645, 2007.

MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. J. M. J. A. F. I. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical journal armed forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DESPRÈS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate immune responses to dengue virus. **Archives of medical research**, v. 36, n. 5, p. 425-435, 2005.

OLIVEIRA, S. A.; RODRIGUES, C.; CAMACHO, L.; MIAGOSTOVICH, M.; ARAÚJO, E. M.; NOGUEIRA, R. Diagnosis of dengue infection by detecting specific immunoglobulin M antibodies in saliva samples. **Journal of virological methods**, v. 77, n. 1, p. 81-86, 1999.

PAULA, I. F. **Elaboração de carta controle da vacina de referência para utilização nos ensaios de potência da vacina da dengue**. 2019. 57f. Monografia (Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

ROTHKÖTTER, H. J.; PABST, R.; BAILEY, M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 72, n. 1-2, p. 157-165, 1999.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Jornal de pediatria**, v. 83, p. S22-S35, 2007.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T. H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J.; SUN, W.; MAROVICH, M. A. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 7, p. 823-829, 2003.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

WHO. World Health Organization. Dengue and severe dengue. **World Health Organization**. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>

XIN, K. Q.; HOSHINO, Y.; TODA, Y.; IGIMI, S.; KOJIMA, Y.; JOUNAI, N.; OKUDA, K. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 223-228, 2003.

XU-AMANO, J.; AICHER, W. K.; TAGUCHI, T.; KIYONO, H.; MCGHEE, J. R. Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. **International immunology**, v. 4, n. 4, p. 433-445, 1992.

ZHANG, Z. S.; YAN, Y. S.; WENG, Y. W.; HUANG, H. L.; LI, S. Q.; HE, S.; ZHANG, J. M. High-level expression of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein and induction of neutralizing antibodies in BALB/C mice. **Journal of virological methods**, v. 143, n. 2, p. 125-131, 2007.