

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Daniel Oliveira dos Santos

PADRÕES HISTOPATOLÓGICOS E SUSCEPTIBILIDADE DE PRIMATAS
NEOTROPICAIS NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA FEBRE
AMARELA

Belo Horizonte

2020

Daniel Oliveira dos Santos

Padrões histopatológicos e susceptibilidade de primatas neotropicais naturalmente infectados pelo vírus da febre amarela

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciência animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de mestre em ciência animal.

Área de concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

Coorientadora: Profa. Tatiane Alves da Paixão

Belo Horizonte

2020

S237p Santos, Daniel Oliveira dos.1993-
Padrões histopatológicos e susceptibilidade de primatas neotropicais naturalmente infectados pelo vírus da febre amarela/ Daniel Oliveira dos Santos. 2020.
45f:il.

Orientador: Renato de Lima Santos
Coorientadora: Tatiane Alves da Paixão
Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
Área de concentração: Patologia Animal
Inclui bibliografia f. 37- 41.

- 1- Primatas – Teses - 2 - Febre amarela - Teses - 3 – Doenças - Teses – 4 – Patologia animal – Teses - I – Santos, Renato de Lima - II – Paixão, Tatiane Alves da - III – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV – Título.

CDD – 636.089

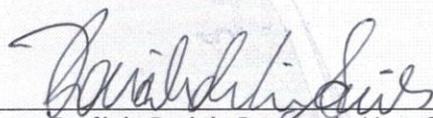
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

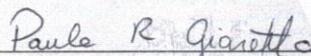
DANIEL OLIVEIRA DOS SANTOS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Patologia Animal.

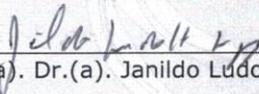
Aprovado(a) em 03 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Dr.(a). Renato de Lima Santos
Presidente - Orientador(a)



Prof(a). Dr.(a). Paula Roberta Giaretta



Prof(a). Dr.(a). Janildo Ludolf Reis Junior



A todos os primatas não humanos vítimas da ignorância humana.

AGRADECIMENTOS

Ao universo que colocou as pessoas certas no meu caminho.

A minha família, meus pais e minhas irmãs por toda compreensão, apoio e paciência.

Aos meus orientadores, Prof^o Renato e Prof^a Tatiane, por sempre me incentivarem a ser o melhor que eu pudesse ser e me fazer pensar e entender as coisas e não só fazer por fazer.

Aos colegas do laboratório, em especial a Ayisa e a Thaynara por sempre me ajudarem quando eu precisei, até nos finais de semana e feriados com blocos infinitos pra cortar, e pelos puxões de orelha quando eu precisei.

Aos amigos que eu fiz na patologia que sempre me lembram que existe mais na vida do que tudo isso aqui e que hoje são com certeza família também. Em especial, Ágna, Clarissa, Samantha, Lucas, Leo, Ricardo, Willian.

As técnicas do laboratório, Leimar e Natália, por me aguentarem tantas horas na 205 e me ajudarem sempre.

Ao Instituto Jorge Vaistman e todos os funcionários e residentes, em especial a médica veterinária Fabiana pela ótima recepção.

Resumo

A febre amarela (FA) é uma doença viral zoonótica importante associada ao óbito de primatas humanos e não humanos. Nesse trabalho foram avaliadas as alterações histopatológicas de primatas neotropicais de vida livre naturalmente infectados com o vírus da FA (VFA) comparados com grupos de primatas não infectados. Alterações hepáticas, caracterizadas por necrose massiva com lipidose e inflamação discreta, foram as mais observadas nos primatas infectados pelo VFA. Hepatite necrotizante intensa foi frequentemente observada em *Alouatta* sp., enquanto *Callithrix* sp. quase não apresentaram lesões hepáticas. A frequência de infecção pelo VFA foi significativamente maior em *Alouatta* sp. quando comparada com *Callithrix* sp. e *Sapajus* sp. Logo, esses dados dão suporte à hipótese de que *Alouatta* sp. é altamente susceptível a infecção e a lesões induzidas pelo VFA, enquanto *Callithrix* sp., apesar de susceptível a infecção pelo VFA, não desenvolvem lesões hepáticas induzidas pelo VFA.

Palavras-chave: *Alouatta*, *Callithrix*, arbovírus, flavivírus, fígado, primatas não humanos.

Abstract

Yellow fever (YF) is an important zoonotic viral disease associated with deaths of both human and non-human primates. Here we evaluated histopathologic changes of free ranging neotropical primates naturally infected with YF virus (YFV) as compared to uninfected cohorts. Hepatic changes characterized by massive necrosis with lipidosis and mild inflammation were the most commonly observed in primates infected with YFV. Importantly, severe necrotizing hepatic lesions were often observed in *Alouatta* sp., whereas *Callithrix* sp. had nearly no hepatic changes. Furthermore, the frequency of YFV infection was significantly higher in *Alouatta* sp. when compared to *Callithrix* sp. or *Sapajus* sp. Therefore, these data support the notion that *Alouatta* sp. is highly susceptible to infection and YFV-induced lesions, whereas although susceptible to infection *Callithrix* sp. do not develop YFV-induced lesions.

Keywords: *Alouatta*, *Callithrix*, arbovirus, flavivirus, liver, non-human primates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frequência de primatas neotropicais positivos para o vírus da febre amarela por espécies.....	29
Figura 2. Frequência de primatas neotropicais positivos para o vírus da febre amarela por sexo e idade.....	29
Figura 3. Fígado de <i>Alouatta</i> sp. positivo para febre amarela.....	31
Figura 4. Fígado de <i>Callithrix</i> sp. positivo para febre amarela.....	31
Figura 5. Fígado de <i>Callithrix</i> sp. positivo para febre amarela.....	32
Figura 6. Correlação entre necrose hepática e lipidose em <i>Alouatta</i> sp. e <i>Callithrix</i> sp.	34
Figura 7. Fígado de <i>Alouatta</i> sp. positivo para febre amarela, imuno-histoquímica para febre amarela.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medianas, limites superiores e inferiores dos escores de lesões histopatológicas hepáticas de primatas neotropicais positivos e negativos para o vírus da febre amarela.....	30
Tabela 2. Medianas, limites superiores e inferiores dos escores histopatológicos das lesões hepáticas de <i>Alouatta</i> sp. (n = 40) e <i>Callithrix</i> sp. (n = 61) positivos e negativos para o vírus da febre amarela.....	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimático)
FA	Febre Amarela
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
IJV	Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaistman
NCR	Non coding regions (Regiões não codificantes)
NS	Proteínas não estruturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frames (Quadros de Leitura Abertos)
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase – Transcriptase Reversa
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta
VFA	Vírus da Febre Amarela

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Vírus da Febre Amarela.....	12
2.2. Histórico.....	13
2.3. Epidemiologia.....	15
2.4. Sinais clínicos.....	17
2.5. Diagnóstico.....	20
2.6. Patogenia.....	21
2.7. Lesões macroscópicas.....	23
2.8. Lesões microscópicas.....	23
2.9. Susceptibilidade de Primatas não humanos.....	25
2.10. Medidas de controle.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Histopatologia.....	27
3.3. Imuno-histoquímica.....	27
3.4. Escore histopatológico.....	28
3.5. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Frequências de primatas neotropicais positivos para febre amarela.....	28
4.2. Avaliação histopatológica.....	30
4.3. Imuno-histoquímica.....	34
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	37
Referências Bibliográficas.....	37
APÊNDICE.....	42

1. INTRODUÇÃO

A Febre Amarela (FA) é uma doença viral hemorrágica transmitida por artrópodes e causada por um flavivírus que acomete tanto primatas humanos quanto primatas não humanos (Litvoc *et al*, 2018). A FA ocorre nos ambientes silvestre e urbano, onde é transmitida para hospedeiros susceptíveis por mosquitos dos gêneros *Haemagogus* sp. e *Sabethes* sp., e *Aedes* sp., respectivamente (Litvoc *et al*, 2018).

No Brasil, a região amazônica é considerada endêmica, porém surtos ocorrem com frequência em regiões não endêmicas. O mais recente ocorreu principalmente na região sudeste do país de 2016 a 2018, levando a mais de mil casos humanos confirmados e a taxa de mortalidade de 35,1% (Duarte-Neto *et al*, 2019).

Primatas neotropicais são susceptíveis ao vírus da FA (VFA) e durante o ciclo silvestre da doença a morte desses animais precede o surgimento de casos humanos (Vasconcelos, 2003). Portanto, o monitoramento da ocorrência da FA em primatas não humanos serve de alerta para a circulação do vírus naquela determinada área, levando a implantação de vacinação preventiva na população humana potencialmente exposta e susceptível, que é a principal medida de prevenção aplicada (Bacha e Johanson, 2017; Monath e Vasconcelos, 2015).

Apesar das alterações histopatológicas associadas a infecção pelo VFA em pacientes humanos já terem sido bem descritas, a quantidade de informação sobre essas alterações em diferentes espécies de primatas não humanos ainda é limitada, tanto em infecções naturais como experimentais (Engelmann *et al*, 2014; Fernandes *et al*, 2017; Monath e Vasconcelos, 2015). Apesar de existirem evidências na diferença de susceptibilidade de diferentes espécies de primatas neotropicais, tais diferenças nunca foram associadas a padrões de alterações patológicas diferentes. De forma geral, *Sapajus* sp. são resistentes enquanto *Alouatta* sp. e *Callithrix* sp. são considerados susceptíveis a FA (Almeida, 2017; Litvoc *et al*, 2018; Monath e Vasconcelos, 2015; Vasconcelos, 2003).

O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações histopatológicas em primatas neotropicais de vida livre naturalmente infectados com VFA provenientes da região de mata atlântica, assim como comparar a intensidade e a natureza das lesões observadas em diferentes espécies de primatas, principalmente *Alouatta* sp. e *Callithrix* sp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Vírus da Febre Amarela

O VFA, membro da família Flaviviridae, é um vírus RNA do gênero *Flavivirus*, assim como outros vírus que causam doença em seres humanos como: Dengue, Zika, vírus do

Oeste do Nilo (*West Nile*), vírus da encefalite japonesa e vírus de *Saint Louis* (Litvoc *et al*, 2018; Vasconcelos 2003; Domingo *et al*, 2018). Por ser transmitido por artrópodes é considerado um arbovírus (do inglês: *arthropod borne virus*) (Litvoc *et al*, 2018). É um patógeno intracelular obrigatório que se replica no citoplasma das células infectadas (Monath, 2001). VFA e outros membros da família Flaviridae se enquadram no grupo de doenças denominadas de febres hemorrágicas virais, onde também são incluídos vírus de outras famílias como Togaviridae (Chikungunya) e Filoviridae (Marburg e Ebola) (Ferreira, 2016).

Apenas um sorotipo do VFA é reconhecido, porém existem pequenas diferenças genéticas que caracterizam duas cepas americanas e cinco cepas africanas distintas, entretanto não se sabe se existem diferenças de patogenicidade entre elas (Vasconcelos, 2003; Mutebi *et al*, 2001).

O genoma do vírus é formado por uma fita simples de RNA não segmentado, de polaridade positiva e constituída de 11 kilobases de comprimento. Possui uma única região codificante (ORF), com cerca de 10.233 nucleotídeos que codificam as proteínas virais, delimitada por duas regiões não codificantes (NCR), uma grande 3'NCR com 511 nucleotídeos e uma pequena 5'NCR com 118 nucleotídeos (Vasconcelos, 2003). O vírion mede 25-40 nm e é envolto por um envelope derivado da membrana da célula hospedeira constituído por bicamada lipoprotéica, medindo então 40-50 nm (Vasconcelos, 2003).

A região do ORF no genoma viral é responsável pela síntese de três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais. As proteínas estruturais são responsáveis por codificar o precursor da proteína da membrana (prM), a proteína que dá origem ao envelope (E) e a proteína do capsídeo viral (C). As proteínas não estruturais tem como função atividades de regulação e expressão do vírus, que incluem replicação, virulência e patogenicidade (Vasconcelos, 2003).

A proteína E, constituinte do envelope viral, é responsável pelas fases iniciais da infecção nas células do hospedeiro, atuando na aderência a membrana das células do hospedeiro e auxiliando na internalização do vírus, além de ser o principal alvo do sistema imunológico do hospedeiro (Monath, 2001). Algumas proteínas não estruturais, como NS1 e NS3, são alvos dos mecanismos de defesa do organismo que agem nas células infectadas. A proteína NS1 é alvo do sistema complemento e a proteína NS3 é alvo dos linfócitos T citotóxicos (Monath, 2001).

2.2. Histórico

O VFA se originou provavelmente no continente africano, se disseminando pelas Américas por meio dos navios que carregavam os escravos africanos e consequentemente os vetores infectados pelo vírus (Litvoc *et al*, 2018; Monath, 2001). O primeiro relato de epidemia nas Américas ocorreu na Península de Yucatán, no

México em 1648, registrado em um manuscrito da civilização maia que descrevia uma epidemia de vômito negro (Litvoc *et al*, 2018). Em 1793, uma epidemia na Filadélfia dizimou aproximadamente 10% da população. Em 1881, o epidemiologista cubano Carlos Finlay sugeriu que a transmissão da doença era através da picada de mosquitos e foi comprovado por Walter Reed *et al* em 1900 que estabeleceu que o *Aedes aegypti*, até então denominado *Culex fasciatus*, era capaz de transmitir a doença depois de se alimentar do sangue de indivíduos doentes (Litvoc *et al*, 2018; Paules e Fauci, 2017; Reed *et al*, 1901).

Baseado nas descobertas de Reed *et al* (1901) foram instituídas campanhas de controle do mosquito, levando a erradicação da doença em Havana em 1902, e ao controle da doença no Panamá em 1906, o que permitiu que a construção do canal fosse concluída (Staples e Monath, 2008). Em 1918, o instituto Rockefeller, formou uma comissão que tinha o objetivo de eliminar o *Aedes aegypti* do meio urbano para erradicar a doença. As medidas aplicadas obtiveram sucesso em controlar a forma urbana da doença, mas com a descoberta de que a FA se tratava de uma zoonose mantida no meio silvestre por outros vetores infectando primatas, o objetivo de erradicação da doença foi suspenso (Soper, 1937; Staples e Monath, 2008).

Apesar de Reed *et al* (1901) terem sugerido que o agente da doença estava presente no sangue, apenas em 1927 o vírus foi isolado pela primeira vez por Adrian Stokes de um paciente de Gana (Litvoc *et al*, 2018; Vasconcelos, 2003; Staples e Monath, 2008). Em 1930, Max Theiler identificou que camundongos eram susceptíveis a inoculação intracerebral, o que levou ao desenvolvimento de testes para detecção de anticorpos neutralizantes que foram utilizados para estudos diagnósticos e epidemiológicos (Staples e Monath, 2008). A partir desses testes foi possível observar que a doença estava presente nas regiões tropicais das Américas e da África mas não era encontrado na Ásia (Staples e Monath, 2008).

A partir de 1960, com o desenvolvimento de outros testes, como inibição da hemoaglutinação e fixação de complemento, a detecção de anticorpos se tornou mais fácil (Staples e Monath, 2008). E a partir de 1970, com o desenvolvimento do cultivo de células de inseto, otimizou-se o isolamento viral (Staples e Monath, 2008). Finalmente, foram desenvolvidos testes de reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa e ensaios imunoenzimáticos específicos (Staples e Monath, 2008).

A partir do vírus isolado em 1927, após 200 passagens em cultivo de células, foi desenvolvida uma cepa atenuada capaz de induzir resposta imune em primatas humanos e em primatas não humanos (Staples e Monath, 2008). Outra vacina foi desenvolvida a partir da atenuação de outra cepa isolada em Dakar em 1927, denominada de Vacina Neurotrópica Francesa que foi amplamente utilizada em algumas regiões da África, mas devido a sua capacidade de levar a doença neurológica em crianças, seu uso foi descontinuado (Staples e Monath, 2008).

No Brasil as primeiras descrições de epidemias são do século XVII. No Rio de Janeiro, a FA era considerada um problema de saúde pública, quando em 1903, Oswaldo Cruz, Diretor Geral de Saúde Pública, aplicou medidas de controle do vetor similares as que

eram adotadas em Cuba, até que em 1907 a epidemia foi controlada na cidade do Rio de Janeiro (Litvoc *et al*, 2018). Entre 1928 e 1929, novos casos surgiram na zona rural do Rio de Janeiro. Nesses casos não havia o envolvimento do *Aedes aegypti* na transmissão da doença, que nesse momento foi chamada de FA silvestre, que estava ligada a transmissão dos primatas não humanos para o homem (Brés, 1986). Em 1942, no Acre, foram registrados os últimos casos de FA urbana, desde então todos os casos notificados são de FA silvestre, quando humanos são infectados em áreas próximas de florestas onde há circulação do VFA (Litvoc *et al*, 2018).

Nas décadas de 1950, 60 e 80, houve várias epidemias de FA na África e nas Américas, com casos surgindo em países onde não haviam registros da doença há bastante tempo, em regiões onde a população não era vacinada ou onde não havia registros da doença (Staples e Monath, 2008). Por meio de vigilância epidemiológica de vetores e primatas, foi possível determinar que essas expansões estavam relacionadas à amplificação do ciclo no meio silvestre (Staples e Monath, 2008). Estima-se que o aumento dos casos de FA na população de primatas não humanos ocorra em intervalos de 5 a 10 anos, o que leva ao aumento no risco de transmissão para os humanos e a ocorrência de surtos nesse mesmo período (Litvoc *et al*, 2018).

Nas últimas epizootias no Brasil, as áreas de ocorrência da doença em primatas não humanos foi se expandindo da região amazônica em direção as regiões centro-oeste e sudeste, assim como para a região sul, levando a doença para regiões de alta densidade populacional, o que é um risco para o reestabelecimento do ciclo urbano (Fernandes *et al*, 2017; Litvoc *et al*, 2018; Monath e Vasconcelos, 2015). O último surto da doença teve início em dezembro de 2016 no estado de Minas Gerais se espalhando rapidamente para os outros estados da região sudeste e para a Bahia (Fernandes *et al*, 2017; Litvoc *et al*, 2018).

No estado do Rio de Janeiro, os casos de FA, tanto de primatas humanos quanto de primatas não humanos, tiveram início durante o ciclo de transmissão de 2016-17, tendo o maior numero de casos registrados no ciclo seguinte (2017-18). Apesar de no último ciclo, não terem sido registrados casos humanos, um caso em *Alouatta* sp. foi registrado. Análises filogenéticas demonstraram que o VFA identificado nesse primata não humano era semelhante às cepas identificadas nos últimos dois ciclos de transmissão, indicando que o vírus foi capaz de sobreviver por mais de três anos nesse ambiente e que há possibilidade da emergência de outra epidemia nos próximos ciclos (Abreu *et al*, 2019).

2.3. Epidemiologia

A doença é considerada endêmica nas regiões de floresta tropical da África e das Américas (Litvoc *et al*, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima 84.000 a 170.000 casos de doença grave nos dois continentes, respectivamente, com cerca de 29.000 a 60.000 óbitos anualmente (Paules e Fauci, 2017). Apesar da presença do vetor

urbano, *Aedes aegypti*, e da população ser susceptível, não existem casos de FA na Ásia que podem ser justificados por proteção cruzada devido a hiperendemia de dengue ou pela incapacidade do vetor de transmitir o vírus (Monath, 2001).

Não foram observadas diferenças de susceptibilidade de nenhuma natureza na espécie humana (Brés, 1986; Vasconcelos, 2003), mas indivíduos do sexo masculino são os mais acometidos pela doença, compreendendo cerca de 80% dos casos, na faixa etária de 15 a 35 anos, devido a maior exposição de indivíduos que desenvolvem funções associadas ao meio silvestre e não por maior susceptibilidade (Litvoc *et al*, 2018; Monath, 2001; Vasconcelos, 2003). O maior número de casos ocorre entre os meses de dezembro e maio, que coincide com o período chuvoso no Brasil (Litvoc *et al*, 2018).

O ciclo de transmissão da doença se baseia nos hospedeiros (primatas humanos e primatas não humanos), nos vetores (Culicídeos) e no local de ocorrência. Os hospedeiros vertebrados, tanto seres humanos como primatas não humanos, atuam como amplificadores do vírus, ou seja, ao serem infectados ocorre multiplicação do vírus que se torna disponível para infectar os vetores apenas durante a fase virêmica. Após essa fase a doença pode evoluir para o óbito ou para a cura do indivíduo que se torna imune a uma nova infecção. Já os vetores, ao entrarem em contato com o vírus, permanecem infectados por toda a vida sendo considerados reservatórios e podem, como no caso do *Haemagogus janthinomys*, transmitir o vírus de forma vertical, via transovariana (Mondet *et al*, 2002; Romano, 2014; Vasconcelos, 2003). Existem dois ciclos no Brasil, o ciclo urbano e o ciclo silvestre, já no continente africano além desses, existe um ciclo intermediário, que ocorre em áreas de transição de florestas (Litvoc *et al*, 2018).

No ciclo silvestre, que ocorre nas regiões de floresta, o vírus circula na população de primatas não humanos susceptíveis e durante a fase virêmica são capazes de infectar os vetores que se alimentam do seu sangue. Logo, os vetores, principalmente dos gêneros *Haemagogus* sp. (*H. janthinomys*, *H. leucocelaemus* e *H. albomaculatus*) e *Sabethes* sp. (*S. chloropterus* e *S. albiprivus*) que se infectaram com o sangue dos hospedeiros infectados são capazes de infectar outros hospedeiros susceptíveis. Nesse contexto, humanos podem se infectar nesses ambientes (Litvoc *et al*, 2018; Vasconcelos, 2003). Na África, os vetores envolvidos no ciclo silvestre são principalmente os mosquitos do gênero *Aedes* sp. (*A. africanus*, *A. furcifer* e *A. simpsoni*), porém o vírus já foi isolado de carrapatos da espécie *Amblyoma variegatum* na África (WHO, 1986).

O ciclo urbano ocorre quando a transmissão do vírus se dá de humano para humano pelo *Aedes aegypti*. A introdução do vírus geralmente ocorre quando um indivíduo humano se infecta no meio silvestre e desenvolve a fase virêmica no meio urbano e infecta o vetor, que a partir disso pode infectar outros hospedeiros. Dessa forma o vírus permanece circulando enquanto houver indivíduos susceptíveis, o que pode ser resolvido com imunização em massa da população com o objetivo de bloquear a transmissão (Litvoc *et al*, 2018; Vasconcelos, 2003). No Brasil a última epidemia (ciclo urbano) ocorreu na cidade do Rio de Janeiro em 1929 e os últimos casos foram registrados em Sena Madureira, no Acre, em 1942, mas na África ela ainda ocorre

(Franco, 1969; Vasconcelos, 2003). Já o ciclo intermediário, ocorre nas regiões de savana africana, a transmissão do vírus ocorre entre humanos e primatas por meio de *Aedes* spp. (Litvoc *et al*, 2018).

Outros animais, como marsupiais e preguiças, podem ter participação na manutenção do VFA, principalmente em áreas onde os primatas não estejam presentes ou a população símia seja imune ao vírus. Na década de 40, durante uma epidemia na Colômbia, não ocorreram casos de primatas acometidos pelo vírus, mas os marsupiais apresentavam anticorpos anti-VFA (Vasconcelos, 2003).

2.4. Sinais clínicos

A FA é uma doença viral aguda de curta duração com gravidade variada, desde casos assintomáticos ou oligossintomáticos até formas mais graves da doença (Almeida, 2017; Monath, 2001; Vasconcelos, 2003). Humanos e primatas não humanos desenvolvem a doença de forma semelhante, diferindo apenas no tempo de evolução da doença que, em primatas não humanos experimentalmente infectados, leva a morte em até uma semana (Romano, 2014). Estima-se que metade dos humanos infectados são assintomáticos (Litvoc *et al*, 2018), e que dos indivíduos que apresentam sinais clínicos, pelo menos 90% dos casos sejam leves ou oligossintomáticos e que apenas 10% apresentam as formas mais graves da doença levando ao óbito (Vasconcelos, 2003).

Segundo Romano (2014), as manifestações clínicas da FA em primatas não humanos é semelhante ao que ocorre em humanos, incluindo amplitude de apresentações clínicas e intensidade de doença, portanto as informações sobre os aspectos clínicos descritas são compatíveis para ambos, humanos e não humanos.

O período de incubação, que compreende o intervalo da picada do mosquito infectado até o início dos sinais clínicos, varia de 3 a 6 dias, chegando até 10-15 dias (Litvoc *et al*, 2018). Após esse período, os indivíduos infectados apresentam três fases clínicas distintas: a fase virêmica, a fase de remissão e a fase toxêmica (Litvoc *et al*, 2018).

A fase virêmica é caracterizada por febre alta, durando em média 3 dias, mialgia, cefaleia, falta de apetite e náusea. Em casos de doença discreta ou moderada, aproximadamente 20-30% dos indivíduos infectados, esses sinais desaparecem dentro de 2 a 4 dias (Litvoc *et al*, 2018). Durante essa fase o vírus se encontra no sangue em títulos de até $10^5 - 10^6$ partículas infecciosas/mL, que servem de fonte de infecção para os vetores (Monath, 2001; Quaresma *et al*, 2013). Após a fase virêmica o indivíduo passa por uma fase de melhora clínica, a fase de remissão, que dura aproximadamente 24 horas. Durante esse período os vírus circulantes são eliminados da corrente sanguínea por meio de resposta imune celular e humoral (Monath, 2001).

Em seguida se inicia a fase toxêmica que acomete cerca de 15% dos infectados. Durante essa fase, há o retorno da febre com piora da mialgia e da cefaleia, acompanhadas de

calafrios e acometimento de outros órgãos e sistemas. Com o desenvolvimento da doença, surge a icterícia e podem ocorrer hemorragias, disfunção renal com oligúria, disfunção do sistema cardiovascular e acometimento neurológico, representado por convulsões (Litvoc *et al*, 2018). Metade dos indivíduos que chegam nessa fase evolui para o óbito, e os demais se recuperam sem sequelas significantes (Litvoc *et al*, 2018).

A principal alteração hematológica mais característica é a leucopenia, com leucócitos entre 1.500 e 2.500 células/mL e neutropenia relativa (Litvoc *et al*, 2018). Entretanto em alguns casos pode-se observar leucocitose em fases mais tardias (Litvoc *et al*, 2018). Geralmente não são observadas alteração dos parâmetros da série vermelha, exceto nos indivíduos que apresentam hemorragia, onde pode ser observada redução do hematócrito e de hemoglobina, além da diminuição do número de plaquetas, que podem chegar a menos de 20.000/cm³ de sangue (Vasconcelos, 2003). Além das alterações plaquetárias, também ocorre a redução de outros fatores de coagulação, principalmente os fatores II, V, VII, VIII, IX e X, com aumento dos tempos de coagulação e de protrombina, redução de fibrinogênio e coagulação intravascular disseminada (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003).

Entre as alterações bioquímicas observadas, destaca-se: baixos níveis de proteína C reativa; hiperbilirrubinemia, mais intensa no final da primeira semana, variando de 10 mg% até 20-30 mg%; aumento de ALT e AST, em casos graves chegando a 5.000 UI/L até mais de 20.000 UI/L, frequentemente é observado um aumento maior de ALT, devido ao efeito citopático que o vírus pode apresentar em células musculares cardíacas e esqueléticas; e aumento de ureia e creatinina (relacionados a piora do quadro do paciente) (Litvoc *et al*, 2018; Vasconcelos, 2003). Quando há acometimento renal, além do aumento de ureia e creatinina, também pode ser observado o aumento de proteína na urina, que pode chegar até 500 mg/100 mL, além da presença de bilirrubina e de hemácias (Vasconcelos, 2003).

Baseado nos sinais clínicos e nas alterações hematológicas e bioquímicas, o quadro clínico pode ser classificado em leve, moderado, grave ou maligno. O quadro leve é caracterizado por sinais clínicos e alterações hematológicas e bioquímicas menos intensas que duram até dois dias e logo o indivíduo se recupera (Litvoc *et al*, 2018; Vasconcelos, 2003). Tais características podem ser comuns a outras doenças infecciosas como malária, outras hepatites virais, febre tifoide e mononucleose, tornando o diagnóstico difícil até mesmo durante as epidemias, se fazendo necessário o uso de métodos específicos de diagnóstico (Vasconcelos, 2003).

Nos casos moderados os sinais clínicos se intensificam e algumas alterações mais específicas podem aparecer, como icterícia, epistaxe e albuminúria. Nesses casos os sinais clínicos persistem até três dias seguidos de recuperação completa (Vasconcelos, 2003). Nas formas graves, os sinais clínicos tem início abrupto caracterizados por febre elevada e cefaleia intensa, acompanhados de sinal de Faget evidente, ou seja, febre elevada acompanhada de bradicardia (Vasconcelos, 2003). Os sinais clássicos da doença, como hemorragias, icterícia e albuminúria, são bem evidentes e a doença

persiste por até 7 dias. Nessa forma o diagnóstico clínico é mais fácil devido a presença evidente dos sinais clínicos clássicos (Vasconcelos, 2003).

Já os casos considerados malignos são caracterizados por insuficiência hepática e renal, com icterícia intensa, elevação de bilirrubina e aminotransferases, e aumento de ureia e creatinina, que pode não ser tão elevado. Há também trombocitopenia intensa, e nos casos onde há coagulação intravascular disseminada também pode ser observado consumo de fibrinogênio e acúmulo de D-dímeros (Litvoc *et al*, 2018).

A intensidade da hemorragia nem sempre está relacionada a redução do número de plaquetas. O que ocorre durante a infecção pelo VFA é o consumo dos fatores de coagulação, principalmente os fatores II, V, VII, VIII, IX e X, com aumento dos tempos de coagulação e de protrombina, redução de fibrinogênio e coagulação intravascular disseminada (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003).

Nos casos graves e malignos as fases de desenvolvimento da doença se tornam mais evidentes. Nos casos leves e moderados, os indivíduos passam pela fase virêmica e se recuperam na fase de remissão dos sinais clínicos, o que não acontece com os casos graves e malignos onde há o retorno dos sinais clínicos durante a fase toxêmica (Vasconcelos, 2003).

A insuficiência renal é observada clinicamente através de oligúria, que evolui para anúria, em indivíduos bem hidratados. Geralmente se manifesta do quinto ao sétimo dia de infecção, e é durante esse período que há a maior frequência de óbitos acometendo cerca de 20 a 50% dos pacientes que apresentam esse quadro (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003).

Até então não existem drogas antivirais específicas para o tratamento de FA, logo todo o tratamento realizado objetiva controlar os sinais clínicos, evitar hemorragias, observar e tratar insuficiência renal, manter hidratação e volemia, evitando drogas com efeito hepatotóxico e acompanhando as alterações hematológicas e bioquímicas do paciente (Litvoc *et al*, 2018; Monath, 2001).

Em 2019, os casos malignos com progressão para insuficiência hepática foram tratados com transplante hepático. Presença de encefalopatia hepática e fator V menor que 20 a 30% que os limites de referência tem sido discutidos como critérios para realização do transplante (Litvoc *et al*, 2018). O Sofosbuvir, droga utilizada para o tratamento de hepatite C, já foi testada com sucesso contra outros flavivírus como Zika e Dengue, está sendo estudada como medicamento antiviral para o tratamento de FA, tendo efeitos satisfatório *in vitro* e *in vivo*, quanto testada em células e camundongos, e quando testada em dois pacientes resultou melhora do quadro geral com diminuição de viremia e melhora dos parâmetros laboratoriais (Freitas *et al*, 2019; Mendes *et al*, 2019).

2.5. Diagnóstico

Como os sinais clínicos iniciais da FA são indistintos de outras doenças virais, a suspeita deve ser investigada em casos com sinais clínicos compatíveis e com epidemiologia suspeita, ou seja, indivíduos com acesso a áreas de risco nos últimos 15 dias ou indivíduos com vacinação com menos de 30 dias (Litvoc *et al*, 2018). O aumento rápido de transaminases, com predomínio de AST sobre ALT, é um indício de FA, já que essa alteração não é observada em outras hepatites virais (Litvoc *et al*, 2018).

A confirmação do diagnóstico pode ser feita por métodos virológicos, moleculares ou sorológicos. O isolamento viral pode ser realizado a partir de amostras de sangue ou tecidos de indivíduos suspeitos. Para tal podem ser utilizados camundongos recém nascidos ou cultivo celular, com células provenientes de primatas (MA-104, Vero, LL-MK2), coelhos (MA-111), hamsters (BHK) e mosquitos (AP-61 e C6/36) (Domingo *et al*, 2018; Vasconcelos, 2003). Na cultura de células o efeito citopático do vírus pode ser observado a partir do quinto dia. Para identificação do vírus nas células cultivadas pode ser realizado teste de imunofluorescência indireta ou fixação do complemento (Vasconcelos, 2003; Monath, 2001). Devido a necessidade do uso de animais de laboratório e a disponibilidade de testes mais rápidos e mais simples, os testes virológicos não são indicados como teste de rotina (Domingo *et al*, 2018).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) de amostras de sangue é outro método de diagnóstico disponível, entretanto deve ser realizado durante o período de viremia, que dura até o quinto dia de infecção, mas pode chegar ao décimo dia em alguns pacientes (Litvoc *et al*, 2018). Dependendo da especificidade da técnica empregada, é possível diferenciar o vírus selvagem da cepa vacinal (Domingo *et al*, 2018). Outras amostras biológicas podem ser utilizadas para o diagnóstico molecular, como urina e sêmen, de onde o RNA viral já foi identificado até 20 dias após o início da doença (Domingo *et al*, 2018).

A partir do quinto dia de doença, testes sorológicos são recomendados para detecção de IgG e IgM. Porém, pode ocorrer reação cruzada com outros flavivírus ou a presença de IgM pode indicar resposta recente a vacinação (Litvoc *et al*, 2018). Reações cruzadas com outros flavivírus podem ocorrer principalmente em regiões endêmicas para múltiplos flavivírus, dificultando o diagnóstico sorológico (Monath, 2001). O principal método sorológico empregado é o ELISA, mas testes de inibição de hemoaglutinação e neutralização podem ser utilizados (Monath, 2001).

A avaliação histopatológica associada a confirmação de antígenos virais por meio de imuno-histoquímica é uma alternativa diagnóstica nos casos de óbito ou de transplante hepático (Domingo *et al*, 2018). As alterações histopatológicas são características da ação do VFA e os antígenos podem ser detectados por imuno-histoquímica nas células de Kupfer e nos hepatócitos. Outros locais de identificação de antígenos incluem: epitélio dos túbulos renais e cardiomiócitos (DeSilva *et al*, 2015; Domingo *et al*, 2018).

Durante períodos de epidemias, o aumento do número de casos de FA resulta em alerta, que torna mais fácil o diagnóstico da doença (Vasconcelos, 2003). Entre as doenças infecciosas, devem ser incluídas como diagnósticos diferenciais: leptospirose, malária, dengue, mononucleose, influenza, hepatites virais (por exemplo, hepatite E e hepatite delta), rickettsia, zika, chikungunya, sepse e febre tifoide (Litvoc *et al*, 2018; Monath, 2001). Entre as causas não infecciosas, os principais diferenciais são a púrpura trombocitopênica idiopática e formas de envenenamento que cursam com hemorragia, como alguns acidentes ofídicos com serpentes peçonhentas (Vasconcelos, 2003). Nesses casos, o histórico clínico, os aspectos epidemiológicos e exames complementares são fundamentais para o diagnóstico definitivo (Vasconcelos, 2003).

2.6. Patogenia

Vários aspectos da patogenia da infecção pelo VFA são provenientes de estudos com primatas não humanos, hamsters, camundongos, e casos de óbitos de seres humanos (Bearcroft, 1957; Tesh, *et al*, 2001; Vasconcelos, 2003; Xiao *et al*, 2001). De forma geral, camundongos são resistentes a infecção por flavivírus. E embora seja um animal amplamente utilizado como modelo experimental e exista grande quantidade de reagentes comerciais disponíveis e padronizados para a espécie, eles não desenvolvem a doença de forma similar aos primatas (Julander, 2016). Em camundongos inoculados experimentalmente, o vírus apresenta comportamento neurotrópico, resultando em encefalite o que não faz dele um bom modelo já que esse tipo de apresentação não é compatível com o que ocorre em primatas humanos e não humanos (Vasconcelos 2003).

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) tem sido utilizados como modelo experimental, pois nesses animais o vírus tem comportamento viscerotrópico. Além disso, há vantagens econômicas em relação ao uso de primatas não humanos e maior facilidade no manejo em laboratório (Tesh *et al*, 2001; Vasconcelos, 2003; Xiao *et al*, 2001). Quando inoculado experimentalmente em hamsters jovens, o vírus pode ser encontrado na corrente sanguínea a partir de 48 horas pós infecção (Tesh *et al.*, 2001). As lesões observadas no fígado desses animais se iniciam no segundo dia após infecção, caracterizadas por necrose dos hepatócitos, inicialmente discreta e se disseminando pelo órgão, e muitas vezes associada a esteatose (Xiao *et al*, 2001). Apesar de desenvolverem lesões muito semelhantes as que ocorrem em primatas, ainda existem limitações para o uso desse modelo experimental como a escassez de reagentes padronizados para essa espécie e a necessidade de se adaptar isolados primários antes de seu uso experimental (Julander, 2016).

Em 1928, macacos Rhesus foram inoculados experimentalmente pela primeira vez com sangue de humanos doentes ou com mosquitos que haviam se alimentado de indivíduos também doentes (Stokes *et al*, 1928). Após a inoculação, esses primatas desenvolveram sinais clínicos semelhantes ao que ocorre nos humanos com tempo de desenvolvimento da doença também semelhante (Stokes *et al*, 1928). Essas características fazem do

modelo símio o modelo experimental ideal para o estudo da FA. Além dos aspectos éticos, alguns pontos são críticos para o uso de macacos Rhesus experimentalmente, principalmente envolvendo custos elevados, quantidade pequena de animais e a dificuldade de trabalhar com esses animais nas condições de nível 3 de biossegurança (Julander, 2016).

Na infecção experimental de macacos Rhesus infectados, o vírus infecta o fígado nas primeiras 24 horas após a inoculação, atingindo primeiro as células de kupfer que sofrem degeneração e necrose até os 3 dias pós infecção. Após o terceiro dia de infecção é possível observar necrose dos hepatócitos com preferência para a região médio-zonal (Bearcroft, 1957; Tigertt *et al.*, 1960). Após infectar o fígado, o vírus pode ser encontrado em outros órgãos como rim, baço, medula e linfonodos (Vasconcelos, 2003).

No homem, após a picada pelo vetor infectado, o vírus é drenado para os linfonodos regionais e fica ausente da circulação sanguínea por 24 horas. Nas células linfoides e nos macrófagos, o vírus se replica e após ser liberado das células atinge a circulação sanguínea e se inicia a fase de viremia. Durante essa fase os sinais clínicos se iniciam e o vírus se torna disponível na circulação sanguínea para infectar outros vetores. É também durante essa fase que o vírus infecta o fígado e os outros órgãos do corpo causando lesões por efeito citopático direto ou por consequência da resposta imunológica do indivíduo (Monath, 2001; Quaresma *et al.*, 2013; Vasconcelos, 2003).

Resposta imune específica se desenvolve rapidamente após a infecção pelo vírus da FA. A resposta humoral foi melhor caracterizada por meio de ELISA. IgM surgem a partir da primeira semana após a infecção, chegando à máxima concentração na segunda semana, posteriormente declinando com o passar dos meses. Já os anticorpos neutralizantes, mais importantes para combater o vírus e evitar a reinfeção, surgem rapidamente e persistem por muitos anos. Não existem relatos de casos de reinfeção pelo VFA. Aparentemente, a infecção prévia com outros flavivírus como dengue, Zika e Wesselsbron, podem ajudar a modular a expressão e a severidade da doença, conferindo proteção cruzada contra FA (Monath, 2001).

Apesar da vacina viva atenuada utilizada para prevenção da FA ser considerada segura, existem casos raros de desenvolvimento de FA secundária a vacinação em diversos países. Em todos os casos o vírus foi detectado por isolamento, PCR ou imunohistoquímica e as lesões observadas foram semelhantes as observadas nos casos de doença natural. Através de avaliação molecular não foram observadas diferenças no genoma dos isolados em relação a cepa vacinal que indicassem alguma reversão de atenuação que pudesse justificar a ocorrência de doença. Logo, os casos foram atribuídos a resposta individual dos acometidos (Chan *et al.*, 2001; Galler *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2001; Vasconcelos, 2003).

2.7. Lesões macroscópicas

As alterações macro e microscópicas observadas tanto em primatas humanos quanto primatas não humanos foram semelhantes em indivíduos com desenvolvimento natural da doença quanto em macacos rhesus inoculados experimentalmente (Hudson, 1928c).

Stokes (1928) e Hudson (1928a/b) inocularam macacos Rhesus com o VFA e descreveram as alterações observadas na necropsia desses animais. A icterícia foi uma característica marcante, sendo observada nas mucosas externas (conjuntival, oral, prepucial e vaginal), na pele da face, no tecido subcutâneo e no tecido adiposo, na íntima da aorta e na traqueia. Hudson (1928a) também observou icterícia na serosa dos órgãos da cavidade abdominal e nos líquidos cavitários (pericárdicos e peritoneais). Hudson (1928a) também observou icterícia mais intensa em indivíduos com curso clínico mais longo.

Hemorragias foram observadas principalmente na mucosa gengival próximo a inserção dos dentes, particularmente dos incisivos, e no trato gastrointestinal, principalmente estômago e intestinos, onde foi observado grande quantidade de sangue no lúmen, por vezes digerido, e hemorragias na mucosa (Hudson, 1928a). No coração, apenas dois animais apresentaram hemorragias no endocárdio (Hudson, 1928a; Stokes *et al*, 1928). Nos pulmões podem ser observadas petéquias tanto na pleura visceral como na superfície de corte (Stokes *et al*, 1928).

O fígado, principal órgão afetado, apresenta coloração amarelada com consistência friável, muitas vezes com aspecto gorduroso (Hudson, 1928a; Stokes *et al*, 1928). Na superfície também podem ser observados vários pontos vermelhos (Engelmann *et al*, 2014).

2.8. Lesões microscópicas

As principais lesões microscópicas observadas em casos de FA são as lesões hepáticas (Hudson, 1928b; Vasconcelos, 2003). São observadas principalmente necrose de hepatócitos e degeneração vacuolar, compatível com lipidose, tanto em seres humanos como em primatas não humanos (Hudson, 1928b; Monath, 2001; Vasconcelos, 2003).

A necrose dos hepatócitos ocorre primariamente na região mediozonal do lóbulo hepático, se estendendo nos casos mais graves em direção a veia central e ao espaço porta, onde é observada uma quantidade pequena de hepatócitos não necrótico que podem estar degenerados (Stokes *et al*, 1928). O padrão de distribuição mediozonal da necrose é característico da infecção pelo VFA e justificado pela replicação do vírus nos hepatócitos dessa região (Monath *et al*, 1989).

Inicialmente a necrose dos hepatócitos ocorre de forma individual, que se inicia na região médio zonal, acomete os outros hepatócitos dessa região e depois se estende para as outras zonas do lóbulo hepático (Bearcroft, 1957). Os hepatócitos perdem a organização de colunas dentro do lóbulo, porém o arcabouço de reticulina permanece íntegro (Domingo *et al*, 2018; Hudson, 1928b; Monath, 2001). Os núcleos dessas células podem estar picnóticos ou cariorréticos e o citoplasma se encontra intensamente eosinofílico (Stokes *et al*, 1928). Essa morfologia dos hepatócitos é compatível com corpos apoptóticos, amplamente conhecidos como corpúsculos de Councilman-Rocha Lima, e seu surgimento é considerado um evento tardio no curso da doença, surgindo nas 24 a 48 horas que antecedem o óbito (Vasconcelos, 2003).

Outras lesões observadas no fígado incluem lipidose e inflamação. A degeneração geralmente é acentuada, e sua intensidade geralmente acompanha a intensidade da necrose (Quaresma *et al*, 2013; Stokes *et al*, 1928; Vasconcelos, 2003). Já o processo inflamatório geralmente não é observado, mas quando está presente é formado por células mononucleares, linfócitos e histiócitos, mas poucos neutrófilos podem ser observados nas áreas de necrose (Quaresma *et al*, 2013; Vasconcelos, 2003). Nas áreas mais extensas de necrose o processo inflamatório se torna menos evidente (Vasconcelos, 2003). Também podem ser observadas células inflamatórias nos sinusoides e áreas de hemorragia (Stokes *et al*, 1928).

As principais lesões renais observadas incluem degeneração das células epiteliais tubulares, por vezes com necrose e núcleos picnóticos, restos celulares nos lúmen dos túbulos, assim como cilindros hialinos e granulares. Processos inflamatórios geralmente não são observados e em casos de óbitos humanos podem ser observados antígenos virais no epitélio tubular (Fernandes *et al*, 2017; Hudson, 1928b; Monath, 2001; Stokes *et al*, 1928). A necrose tubular é um achado considerado terminal que coincide com quadros de insuficiência renal de pacientes que desenvolvem oligúria e anúria (Vasconcelos, 2003).

Nos tecidos linfoides, seja no baço, nos linfonodos ou em agrupamentos linfoides de outros órgãos como pulmão e trato gastrointestinal, podem apresentar redução do tamanho dos folículos linfoides com centro germinativos pouco evidentes que frequentemente estão necróticos (Hudson, 1928b; Monath, 2001; Stokes *et al*, 1928). No baço, além das alterações do tecido linfoide já mencionadas, pode haver aumento difuso e moderado da quantidade de neutrófilos na polpa vermelha e congestão (Hudson, 1928b; Stokes *et al*, 1928).

Hemorragias podem ser observadas em diversos órgãos, principalmente no pulmão, onde surgem como focos discretos atingindo grupos pequenos de alvéolos ou na região subpleural, e no trato gastrointestinal, onde também são discretas e encontradas nas mucosas (Hudson, 1928b; Stokes *et al*, 1928).

Lesões cardíacas são pouco frequentes, mas quando presentes são caracterizadas por degeneração das fibras musculares, muitas vezes associadas a acúmulo de lipídeos (Hudson, 1928b; Stokes *et al*, 1928). Apoptose dos cardiomiócitos pode ser observada

em alguns casos, e nessas células a lesão é induzida pela ação direta do vírus e antígenos virais podem ser encontrados (Monath, 2001).

Um achado interessante descrito em macacos Rhesus experimentalmente infectados é a necrose da região cortical da adrenal, acometendo células individuais ou grupos de células. Frequentemente há infiltrado neutrofílico associado às áreas de necrose (Hudson, 1928b; Stokes *et al*, 1928). Esse achado não é observado em pacientes humanos (Hudson, 1928c).

2.9. Susceptibilidade de Primatas não humanos

Os primatas não humanos, tanto de Velho Mundo quanto das Américas, são os hospedeiros silvestres primários do VFA. Os primatas africanos são resistentes a infecção pelo vírus, provavelmente por terem evoluído junto com o vírus e se adaptado a ele, conseqüentemente não desenvolvendo doença (Almeida, 2017; Vasconcelos, 2003). Já nas Américas, todos os primatas não humanos são susceptíveis a infecção pelo vírus, sendo os gêneros *Alouatta*, *Aotus*, *Ateles*, *Brachyteles*, *Callithrix*, *Sapajus*, *Lagothrix*, *Pithecia*, *Saguinus*, e *Saimiri* hospedeiros em potencial (Almeida, 2017). Enquanto algumas espécies são altamente sensíveis, como as do gênero *Alouatta*, e desenvolvem quadros fulminantes após infecção, servindo como sentinelas para a circulação do vírus (Almeida, 2017; Vasconcelos, 2003). Além de *Alouatta* sp., em *Calithrix* sp., *Leontopithecus* sp. e *Chiropotes* sp. há ocorrência de doença espontânea e morte, enquanto outras espécies são altamente resistentes, como as do gênero *Sapajus* sp., *Ateles* sp. e *Saimiri* sp., que raramente desenvolvem doença grave (Holzman *et al*, 2010; Moreno *et al*, 2001; Moreno *et al*, 2013; Rawlins *et al*, 1990; Vasconcelos 2003).

É importante ressaltar que primatas não humanos ao terem contato com o VFA tem comportamento clínico semelhante a pacientes humanos. Portanto, quando infectados podem desenvolver a doença em níveis diferentes, variando de acordo com a espécie, com período de viremia geralmente curto, de 2 a 5 dias. Essas características fazem desses indivíduos hospedeiros do vírus no meio silvestre, entretanto não devem ser considerados reservatórios, pois após exposição ao vírus os animais que não morrem devido a doença desenvolvem imunidade protetora para toda a vida (Romano, 2014).

2.10. Medidas de controle

Todos os casos de FA, inclusive os suspeitos com investigação em andamento, devem ser notificados imediatamente para as autoridades sanitárias (Vasconcelos, 2003). Além da notificação nacional, surtos de FA, assim como de cólera e de peste, estão sujeitos ao Regulamento Sanitário internacional e devem ser notificados aos países vizinhos para que as medidas de prevenção sejam devidamente aplicadas (Vasconcelos, 2003).

A identificação de primatas não humanos positivos para FA (epizootias) serve como alerta para a circulação do vírus, e nas áreas onde elas ocorrem devem ser iniciadas medidas de prevenção e controle da doença (Bacha e Johanson, 2017). Para o diagnóstico de epizootias, devem ser coletados durante a necropsia fragmentos de fígado, baço, coração, rim e sistema nervoso, conservados em solução de formalina a 10%, para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica, e refrigerados/congelados para exames virológicos (Brasil, 2017).

A principal forma de prevenção da doença no homem é a vacinação, com a cepa vacinal 17D desenvolvida por Max Theiler em 1937, considerada segura e altamente efetiva, conferindo imunogenicidade de 90 a 98% depois de 10 dias e gerando efeitos adversos graves em 1255 de 333 milhões de doses aplicadas (Litvoc *et al*, 2018; Staples *et al*, 2015). Dos indivíduos que adoecem após a vacinação, alguns desenvolvem o quadro visceral típico da FA e outros a forma neurológica da doença (Staples *et al*, 2015). Indivíduos vacinados apresentam títulos baixos do vírus na corrente sanguínea nos primeiros dias após a vacinação, porém esses vírus não oferecem risco de transmissão para os vetores já que a cepa vacinal perdeu a capacidade de infectar os mosquitos e a carga viral é baixa (Monath, 2001).

Atualmente, segundo a OMS, é recomendada uma única dose da vacina, modificando a recomendação anterior de revacinação após 10 anos (Litvoc *et al*, 2018). A vacina é contraindicada em indivíduos imunossuprimidos, que passaram por transplante de órgãos há menos de dois anos, histórico de doença tímica, com lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide ou infecção pelo HIV avançada, indivíduos com menos de 9 meses de idade ou com histórico de hipersensibilidade a algum componente da vacina (Litvoc *et al*, 2018; Staples *et al*, 2015).

Durante a epidemia que ocorreu em Angola e no Congo entre 2015 e 2016, foi utilizada uma dose fracionada da vacina para imunizar maior número de pessoas e a contenção da epidemia foi adequada (Litvoc *et al*, 2018). Em 2018, durante a epidemia no Brasil, estados como São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, adotaram a mesma medida. Estudos sugerem que a dose fracionada confere os mesmos níveis de anticorpos que a dose completa, entretanto ainda não se sabe sobre a durabilidade dos mesmos (Litvoc *et al*, 2018; WHO, 2017). Baseado nesses estudos, a OMS recomenda a utilização de doses fracionadas apenas em casos de emergência, quando os estoques de vacina não forem suficientes para toda a população e não como modificação permanente do protocolo vacinal (WHO, 2017).

Outras medidas para o controle da doença incluem o controle dos vetores no ambiente, o que é inviável no meio silvestre, e aplicação de métodos de proteção individual (Vasconcelos, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

De 2016 a 2018, o setor de patologia no Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaistman (IJV, Rio de Janeiro, Brasil) recebeu 1.304 primatas neotropicais de vida livre que foram encontrados mortos em todas regiões do estado do Rio de Janeiro (Brasil). Espécie, sexo, e idade estimada foram registrados antes da necropsia. Amostras de fígado, baço, coração e encéfalo foram coletados e submetidos para o laboratório oficial de diagnóstico de Febre Amarela, Fiocruz (Rio de Janeiro, Brasil).

3.2. Histopatologia

Amostras de fígado, baço, coração, encéfalo, rim e pulmão foram fixadas em solução de formol tamponada a 10% e processadas para avaliação histológica. Os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, seguidas de imersão em xilol e embebição em parafina histológica. Os blocos foram encaminhados ao laboratório de Histopatologia da UFMG. Cortes com 3 a 4 µm de espessura foram montados em lâmina histológica e corados com hematoxilina e eosina, e quando necessário corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e azul da Prússia.

3.3. Imuno-histoquímica

A distribuição dos antígenos virais nos tecidos hepáticos foi determinada por meio de imuno-histoquímica realizada no laboratório de histopatologia da UFMG. Cortes com 3 a 4 µm de espessura foram desparafinizados e hidratados em xilol e concentrações decrescentes de álcool etílico. A recuperação antigênica foi feita em panela de pressão por 10 min com uma solução de pH alto (9,0) a base de EDTA (EnVision™ Flex Target Retrieval Solution, High pH, Dako, EUA). Em seguida foi feito bloqueio de peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio e bloqueio de proteínas inespecíficas com solução de leite desnatado a 3%. Foi utilizado como anticorpo primário policlonal, soro hiperimune anti-FA produzido em coelho (diluição 1:3000). A reação foi desenvolvida com o polímero do kit Novolink Polymer Detection System (Leica, UK), revelada com o cromógeno AEC (Dako, USA) e contracorada com hematoxilina. Como controles positivos foram utilizados cortes de fígados de humanos previamente diagnosticados com febre amarela.

3.4. Escore histopatológico

Baseado nos resultados de RT-PCR provenientes do laboratório oficial de diagnóstico, dois grupos foram definidos: um formado por 57 primatas neotropicais positivos para o VFA, e outro de 51 animais negativos para o VFA e sem lesões sugestivas de FA ou outras doenças infecciosas. Os animais do grupo controle negativo foram selecionados de forma que as espécies, sexo e idades aproximadas coincidissem com o grupo controle positivo. As lâminas foram avaliadas de forma cega por dois patologistas veterinários e escores histopatológicos foram estabelecidos para lesões específicas de cada órgão. Os critérios para definição do escore de cada lesão nos diferentes órgãos estão descritos no Apêndice 1.

3.5. Análise estatística

As frequências de lesões observadas entre os grupos foram comparadas utilizando o teste Qui-quadrado. O escore histopatológico foi comparado usando o teste não paramétrico *Mann Whitney* e o teste de correlação de *Spearman*. As análises estatísticas foram feitas com o programa Graphpad Prism versão 7.0.

4. RESULTADOS

4.1. Frequência de primatas neotropicais positivos para febre amarela

Dos 1.304 primatas neotropicais encontrados mortos e necropsiados no estado do Rio de Janeiro no período de 2016 a 2018 as espécies mais comuns foram *Callithrix* sp. (n = 1.219), seguido de *Alouatta* sp. (n = 48), *Sapajus* sp. (n = 26), *Leontopithecus* sp. (n = 7) e *Callicebus* sp. (n = 4). No total, 57 primatas foram considerados positivos para FA pelo laboratório oficial de diagnóstico. Todas as espécies incluídas nesse trabalho apresentaram pelo menos um indivíduo positivo para FA, sendo *Alouatta* sp. e *Callithrix* sp. as que apresentaram maior número de indivíduos positivos, 42% e 2,54 %, respectivamente (Figura 1). Não foram observadas diferenças estatísticas nas frequências de animais positivos quanto a sexo e idade dos animais (Figura 2A e B).

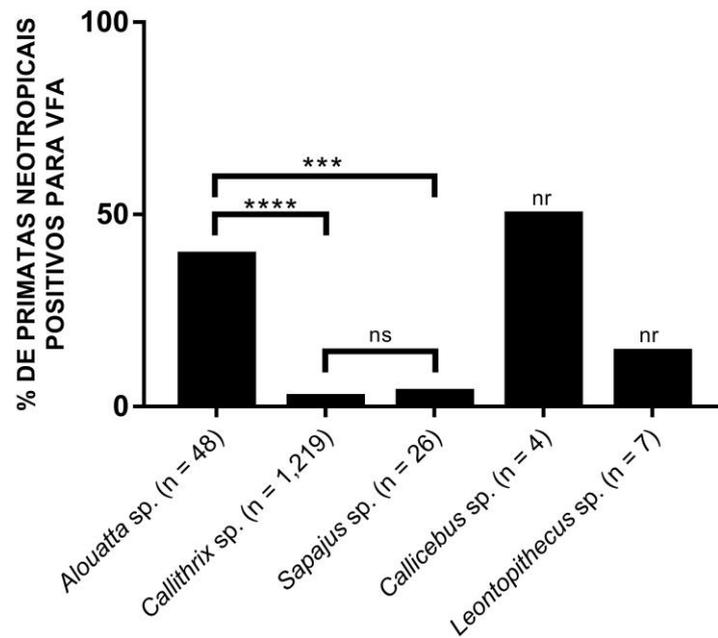


Figura 1. Frequência de primatas neotropicals positivos para o vírus da febre amarela por espécie. As frequências foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado. * $p < 0,0001$, ns = não significativo, nr = não realizado. O número de amostras de *Callicebus* sp. e *Leontopithecus* sp. foi insuficiente para análise estatística.

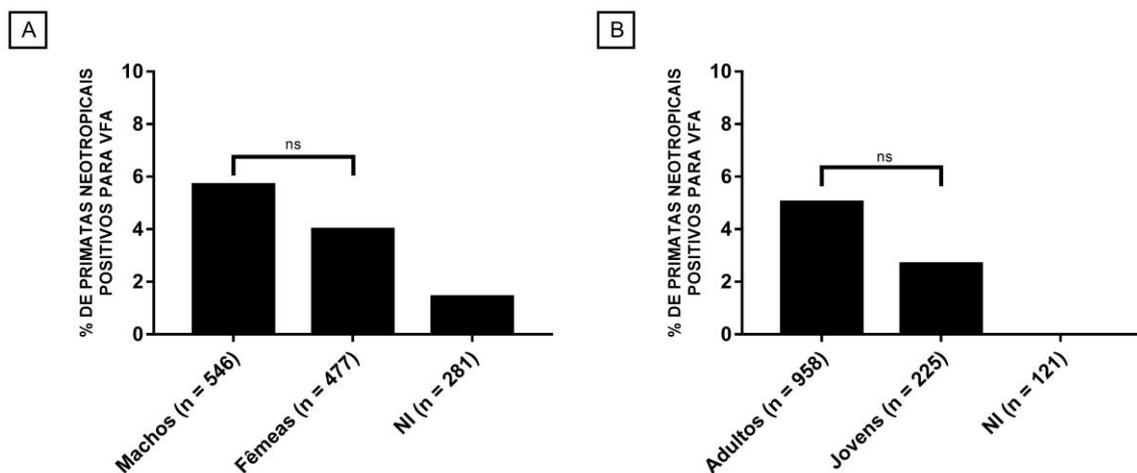


Figura 2. Frequência de primatas neotropicals positivos para o vírus da febre amarela por sexo e idade. A) Frequência de primatas neotropicals positivos para o vírus da febre amarela por sexo. As frequências foram comparadas pelo teste de Chi-quadrado. $p = 0,2099$. B) Frequência de primatas neotropicals positivos para o vírus da febre amarela por idade estimada. As frequências foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado. $p = 0,6785$.

4.2. Avaliação histopatológica

Para avaliar a intensidade das lesões observadas, foi definido um sistema de escore histopatológico (Apêndice 1). Fígado, rim, baço, coração, pulmão e encéfalo foram incluídos na avaliação histopatológica, mas apenas as lesões hepáticas apresentaram resultados estatisticamente significantes quando primatas infectados pelo VFA foram comparados com os primatas do grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Medianas, limites superiores e inferiores dos escores de lesões histopatológicas hepáticas de primatas neotropicais positivos e negativos para o vírus da febre amarela.

Lesões hepáticas	FA	Escore (mediana)	Limite superior	Limite inferior
Necrose	+	3****	4	0
	-	0	2	0
Infiltrado linfo-histioplasmocítico	+	1	3	0
	-	1	3	0
Infiltrado neutrofílico	+	0,75	2,50	0
	-	0,50	2	0
Infiltrado total	+	2*	5	0
	-	1	5	0
Lipidose	+	1****	3	0
	-	0	2	0
Glicogenose	+	0	3	0
	-	1**	3	0

Medianas dos escores foram comparadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney: * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; **** $P < 0,0001$.

Necrose hepática intensa (Figura 3A) foi a alteração associada a FA mais comum e significativa, afetando 71,43% dos primatas neotropicais infectados. Essa lesão com muita frequência se estende para todas as zonas do lóbulo hepático (Figura 3B). Hepatite foi observada tanto no grupo de animais positivos como nos negativos, porém significativamente mais intensa nos primatas positivos para FA. Nesses casos o infiltrado inflamatório encontrado é formado por linfócitos, plasmócitos e histiócitos, mas em alguns casos também podem ser observados neutrófilos (Figura 4). Processos degenerativos hepáticos também foram observados nos dois grupos de primatas avaliados. Primatas positivos para FA tiveram frequências maiores de lipidose (64,29%) e frequências menores de degeneração glicogênica (35,71%) (Figura 5A e B) quando comparados com o grupo de primatas negativos, que tiveram 32,79% de lipidose e 66,67% de degeneração glicogênica.

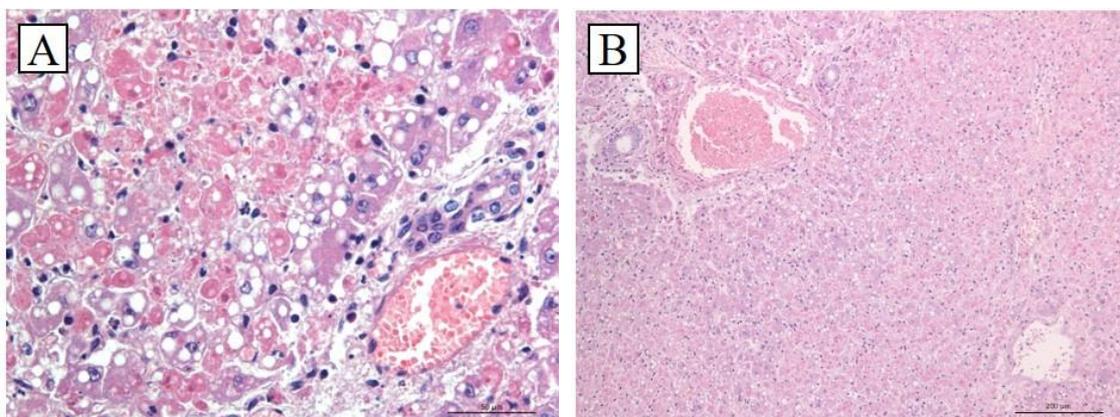


Figura 3. Fígado de *Alouatta* sp. positivo para febre amarela. A) Necrose massiva dos hepatócitos e degeneração vacuolar (lipidose) dos hepatócitos não necróticos. Hematoxilina e eosina, 400x. B) Necrose massiva dos hepatócitos afetando todas as regiões do lóbulo hepático. Hematoxilina e eosina, 50x.

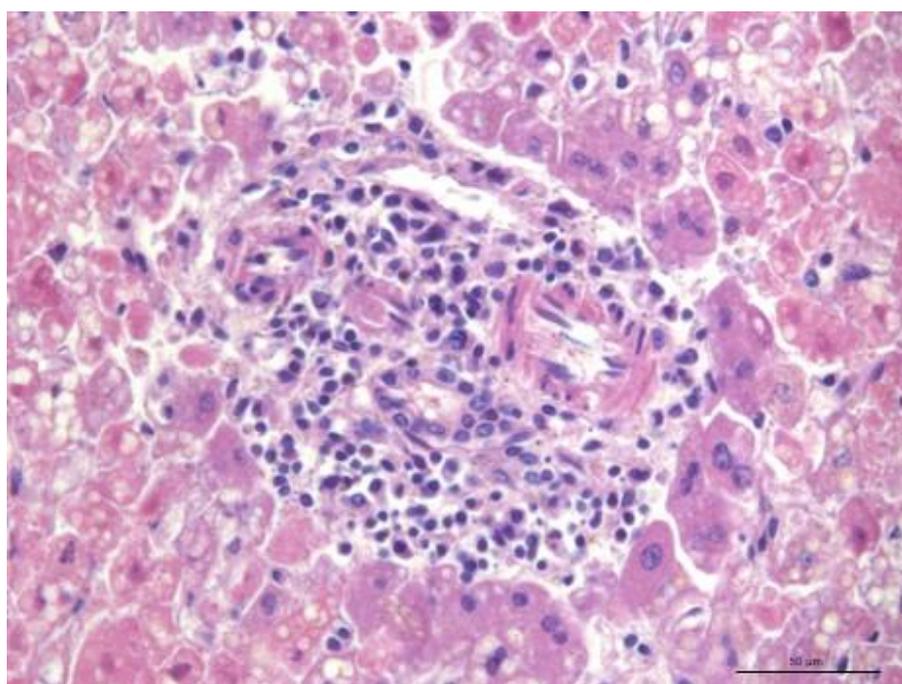


Figura 4. Fígado de *Callithrix* sp. positivo para febre amarela. Necrose massiva e hepatite linfohistiocítica. Espaço porta com infiltrado inflamatório moderado composto de linfócitos e macrófagos com alguns neutrófilos, necrose massiva dos hepatócitos. Hematoxilina e eosina, 400x.

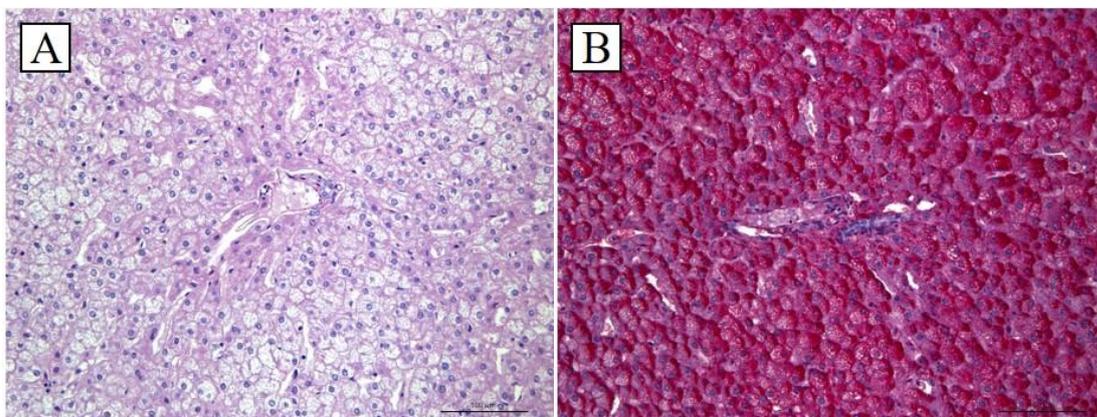


Figura 5. Fígado de *Callithrix* sp. positivo para febre amarela. A) Degeneração glicogênica, caracterizada por hepatócitos com degeneração microvacuolar morfológicamente compatível com glicogenose. Hematoxilina e eosina, 200x. B) Degeneração glicogênica intensa com acúmulo abundante de material PAS-positivo intracitoplasmático, compatível com glicogênio. Ácido Periódico de Schiff (PAS), 200x.

Para comparar a intensidade de lesões entre diferentes espécies de primatas neotropicais, foram comparados os escores histopatológicos de *Alouatta* sp. e *Callithrix* sp. positivos e negativos para FA (Tabela 2). Baseado nessa avaliação, primatas do gênero *Alouatta* sp. tiveram escores histopatológicos maiores para necrose, hepatite e lipidose quando comparados com *Callithrix* sp. Especificamente, 91,3% dos *Alouatta* sp. positivos para FA apresentaram escores elevados de necrose hepática (de 2 a 4) contrastando com os *Callithrix* sp., dentre os quais apenas 34,5% dos indivíduos apresentaram escores elevados. De forma similar, a hepatite também foi mais intensa nos *Alouatta* sp. quando comparados com *Callithrix* sp.

Lipidose foi uma lesão observada de forma mais intensa em *Alouatta* sp. positivos para FA, sendo que 95,6% desses animais apresentaram algum grau de degeneração lipídica, e os escores de lipidose tendem diminuir a medida que os escores de necrose aumentam, como demonstrado pelo teste de correlação de Spearman (Figura 6A). Já nos *Callithrix* sp., lipidose não foi um achado tão frequente (37,9%), porém sua correção com a necrose foi o oposto do observado em *Alouatta* sp. Para esse grupo de animais, quanto maior o escore de necrose, maior o escore de lipidose (Figura 6B). Degeneração glicogênica, confirmada pela coloração histoquímica de PAS (Figura 5B), foi identificada tanto em *Callithrix* sp. positivos como negativos (62% e 81,25%, respectivamente).

Tabela 2. Medianas, limites superiores e inferiores dos escores histopatológicos das lesões hepáticas de *Alouatta* sp. (n = 40) e *Callithrix* sp. (n = 61) positivos e negativos para o vírus da febre amarela.

Lesões hepáticas	Espécies	FA	Escore (mediana)	Limite superior	Limite inferior
Necrose	<i>Alouatta</i> sp.	+	4****	4	0
		-	0	2	0
	<i>Callithrix</i> sp.	+	0,25**	4	0
		-	0	2	0
Infiltrado linfo-histioplasmocítico	<i>Alouatta</i> sp.	+	1,50***	3	0
		-	1	2	0
	<i>Callithrix</i> sp.	+	1	2	0
		-	1	3	0
Infiltrado neutrofilico	<i>Alouatta</i> sp.	+	0,75*	2,50	0
		-	0	1	0
	<i>Callithrix</i> sp.	+	0,50	2,50	0
		-	0,50	2	0
Infiltrado total	<i>Alouatta</i> sp.	+	2,25***	5	0
		-	1	3	0
	<i>Callithrix</i> sp.	+	1,50	4	0
		-	2	5	0
Lipidose	<i>Alouatta</i> sp.	+	1****	3	0
		-	0	2	0
	<i>Callithrix</i> sp.	+	0	2	0
		-	0	2	0
Glicogenose	<i>Alouatta</i> sp.	+	0	0,50	0
		-	0	1	0
	<i>Callithrix</i> sp.	+	1,75	3	0
		-	2,25	3	0

Medianas dos escores foram comparadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.*
 $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$; **** $P < 0,0001$.

Pigmentos intracelulares em hepatócitos foram observados tanto em primatas positivos como negativos para FA (30,35% e 29,41%, respectivamente), mas apenas uma parte desses casos (17,64% e 26,66% dos primatas positivos e negativos, respectivamente) foi positiva na coloração histoquímica Azul da Prússia. Portanto, hemossiderose não foi um achado relevante nesses animais.

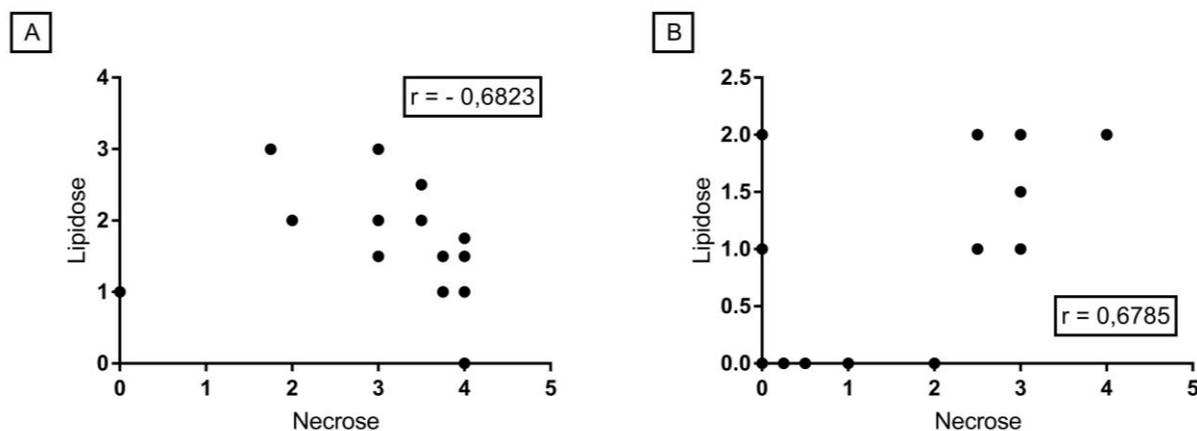


Figura 6. Correlação entre necrose hepática e lipidose em *Alouatta* sp. e *Callithrix* sp. A) Correlação entre necrose hepática e lipidose em *Alouatta* sp. Teste de correlação de Spearman ($r = -0,06823$; $***p = 0,0001$). B) Correlação entre necrose hepática e lipidose em *Callithrix* sp. Teste de correlação de Spearman ($r = 0,6785$; $****p = 0,0003$).

4.3. Imuno-histoquímica

Imuno-histoquímica foi utilizada para determinar a localização do VFA no fígado de animais positivos para FA. Foi utilizado um anticorpo policlonal anti-FA produzido em coelho e antígenos foram observados no citoplasma de hepatócitos, principalmente aqueles localizados na região mediozonal do lóbulo hepático (Figura 7).

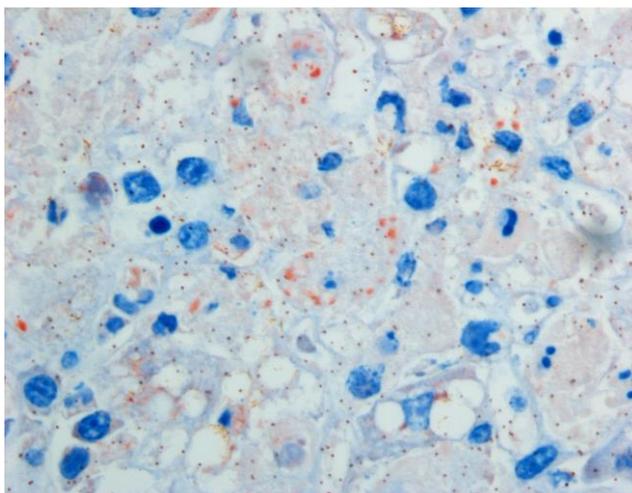


Figura 7. Fígado de *Alouatta* sp. positivo para febre amarela, imuno-histoquímica para febre amarela. Hepatócitos com marcação de antígenos (em vermelho) no citoplasma de hepatócitos da região mediozonal. Imuno-histoquímica anti-febre amarela, 400x.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo, foram avaliadas diversas espécies de primatas neotropicais naturalmente infectados pelo VFA, porém *Alouatta* sp. e *Callithrix* sp. foram os mais frequentes na população estudada, incluindo 23 e 30 indivíduos positivos para FA, respectivamente. Enquanto em outras espécies como *Callicebus* sp., *Sapajus* sp., e *Leontopithecus rosalia* apenas 2, 1 e 1 indivíduos positivos para FA foram identificados, respectivamente. O espectro de espécies avaliadas incluiu primatas neotropicais de vida livre de uma vasta região geográfica de mata atlântica, fornecendo informações preciosas sobre o padrão de alterações histopatológicas e de susceptibilidade a infecção pelo VFA.

Os resultados demonstram diferenças claras no padrão de lesões hepáticas entre espécies diferentes de primatas neotropicais infectados pelo VFA que nunca foram estudadas antes. Existem relatos de diversas espécies de primatas não humanos susceptíveis a infecção pelo VFA, e presumidamente existem diferenças de susceptibilidade entre essas espécies (Almeida, 2017; Litvoc *et al.*, 2018; Monath e Vasconcelos, 2015; Vasconcelos, 2003). *Alouatta* sp. e *Callithrix* sp., espécies que compõem a maior parte da população avaliada nesse trabalho, são consideradas susceptíveis a FA, enquanto as outras espécies avaliadas, com exceção de *L. rosalia* são consideradas resistentes (Almeida, 2017; Litvoc *et al.*, 2018; Monath e Vasconcelos, 2015; Vasconcelos, 2003).

Comparando as alterações histológicas entre *Alouatta* sp. e *Callithrix* sp. foi possível indicar dois padrões claramente distintos de lesão: 1) necrose hepática massiva com infiltrado inflamatório discreto a moderado e lipidose ocasional, indicando uma manifestação grave da doença, que foi mais observada no indivíduos do gênero *Alouatta* sp. (com exceção de um indivíduo); e 2) ausência de necrose com inflamação discreta e degeneração glicogênica ocasional e não específica, mais observado em *Callithrix* sp. Esses achados suportam a hipótese de que *Alouatta* sp. são altamente susceptíveis a lesão hepática severa induzida pelo VFA, enquanto *Callithrix* sp. são resistentes. Entre as outras espécies avaliadas, os dois *Callicebus* sp. e o único *L. rosalia* positivos para FA apresentaram lesões compatíveis com o padrão de lesão hepática grave, enquanto o único *Sapajus* sp. infectado apresentou degeneração glicogênica difusa com infiltrado inflamatório discreto sem sinais de necrose, o que corrobora com os relatos prévios da resistência dessa espécie (Almeida, 2017; Litvoc *et al.*, 2018; Monath e Vasconcelos, 2015; Vasconcelos, 2003).

Não foram observadas diferenças significativas na frequência de primatas positivos com relação a sexo e idade. Em seres humanos, indivíduos adultos do sexo masculino são os mais frequentemente infectados, não devido a uma maior susceptibilidade, mas devido a uma maior exposição ao ambiente silvestre (Litvoc *et al.*, 2018), um padrão de comportamento que, obviamente, não altera o risco de primatas não humanos.

Necrose/apoptose hepática foi a lesão hepática mais importante observada nos fígado de primatas positivos para FA, que também é a lesão descrita mais relevante em humanos

infectados pelo vírus (Quaresma *et al*, 2013). A necrose geralmente é grave e se estende da região mediozonal para as regiões centrolobulares e portais, onde são observados apenas alguns hepatócitos não afetados. Esse e o padrão clássico de lesões previamente descritas em pacientes humanos (Quaresma *et al*, 2013), e também é compatível com lesões descritas em macacos Rhesus experimentalmente infectados pelo vírus (Stokes *et al*, 1928). Esse padrão é associado ao tropismo do vírus pelos hepatócitos (Monath, 2001), cuja localização foi demonstrada por meio de imuno-histoquímica.

Lipidose foi outra lesão observada frequentemente nesse trabalho e também descrita em fígados humanos explantados de pacientes submetidos a transplante (Duarte Neto *et al*, 2019; Quaresma *et al*, 2013; Song *et al*, 2019; Vieira *et al*, 2019). *Alouatta* sp. apresentaram escores menores de lipidose quando comparados com os escores de necrose, o que pode ocorrer devido a maior perda de hepatócitos associados a intensidade da doença nessa espécie.

A resposta inflamatória hepática observada nesse trabalho foi discreta e composta principalmente de linfócitos e macrófagos. Nos casos de FA geralmente não se observa um processo inflamatório evidentes, mas quando presente é discreto e formado pela mesma população de células observadas neste estudo (Monath e Vasconcelos, 2015; Quaresma *et al*, 2013; Vasconcelos, 2003). A intensidade discreta da resposta inflamatória durante a infecção pelo VFA é associada à ação do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que induz apoptose enquanto age como uma citocina anti-inflamatória (Monath e Vasconcelos, 2015).

Surtos de FA ocorrem em intervalos de 5 a 10 anos, e os casos humanos são precedidos por um aumento de casos na população de primatas não humanos, associado ao aumento de susceptibilidade dos indivíduos dessa população (Litvoc *et al*, 2018). Nesse contexto, indivíduos resistentes a infecção, após contato com o vírus desenvolvem imunidade prolongada, levando a um aumento da população de primatas imunes ao vírus com conseqüente diminuição das epizootias e um menor risco de transmissão para o homem. Nesse grupo podem ser incluídos os membros dos gêneros *Sapajus* sp. e, como demonstrado nesse trabalho, *Callithrix* sp.

Em pacientes humanos infectados pelo VFA, insuficiência renal secundária a necrose tubular aguda é uma complicação importante em casos fatais (Monath e Vasconcelos, 2015). Entretanto, nesse trabalho, as lesões tubulares não foram observadas em nenhum dos animais positivos, em concordância com Monath (2001) que descreve que em primatas não humanos a função renal não é alterada, mas contrasta com relatos prévios de degeneração e necrose tubular discreta em macacos Rhesus experimentalmente infectados (Hudson, 1928; Stoked, 1928). VFA é um vírus viscerotrópico e a cepa vacinal é capaz de produzir encefalite em seres humanos jovens (Monath, 2001). Entretanto lesões neurológicas não foram observadas em nenhum dos primatas jovens avaliados.

6. CONCLUSÃO

Esse estudo resultou na identificação de padrões histopatológicos distintos em casos de infecção natural pelo VFA assim como respostas variáveis de hospedeiros de diferentes espécies, com *Alouatta* sp. sendo altamente susceptível a lesão hepática induzida pela ação do VFA, enquanto *Callithrix* sp., considerada uma espécie susceptível é claramente mais resistente as lesões hepáticas associadas ao VFA.

Referências Bibliográficas

ABREU, F. V. S.; DELATORRE, E.; SANTOS, A. A. C. *et al.* Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, p. 1-10, 2019.

ALMEIDA, M. A. B. *Yellow Fever*. In: FUENTES, A. The International Encyclopedia of Primatology. 1 ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, p. 1-2, 2017.

BACHA, H. A.; JOHANSON, G. H.. Yellow fever. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 63, n. 4, p. 291-292, 2017.

BEARCROFT, W. G. C. The histopathology of the liver of yellow fever-infected rhesus monkeys. *Journal of Pathology and Bacteriology*. v. 74, n. 2, p. 295-303, 1957.

BRASIL. *Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela*. 2 ed. Brasília : Ministério da Saúde, p. 50-60, 2017.

BRÉS, P. L. J. A century of progress in combating yellow fever. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 64, n. 6, p. 775, 1986.

CHAN, R. C.; PENNEY, D. J.; LITTLE, D. *et al.* Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine. *The Lancet*, v. 358, n. 9276, p. 121-122, 2001.

DESILVA, M.; SHARMA, A.; STAPLES, E. *et al.* Fatal Yellow Fever vaccine-associated viscerotropic disease—Oregon, September 2014. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, v. 64, n. 10, p. 279, 2015.

DOMINGO, C.; CHARREL, R. N.; SCHMIDT-CHANASIT, J. *et al.* Yellow fever in the diagnostics laboratory. *Emerging Microbes & Infections*, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2018.

DUARTE-NETO, A. N.; CUNHA, M. P.; MARCILIO, I. *et al.* Yellow Fever and Orthotopic Liver Transplantation: new insights from the autopsy room for an old but reemerging disease. *Histopathology*, v. 75, p. 638-648, 2019.

ENGELMANN, F.; JOSSET, L.; GIRKE, T. *et al.* Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic yellow fever in a rhesus macaque model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 11, p. e3295, 2014.

FERNANDES, N. C. C. A.; CUNHA, M. S.; GUERRA, J. M. *et al.* Outbreak of yellow fever among nonhuman primates, Espirito Santo, Brazil, 2017. *Emerging Infectious Diseases.*, v. 23, n. 12, p. 2038-2041, 2017.

FERREIRA, M. S. *Síndrome da febre hemorrágica de etiologia viral.* In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia, 9. d. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2016.

FRANCO, O. História da febre amarela no Brasil. Rio de Janeiro : Departamento Nacional de Endemias Rurais, Ministério da Saúde, 1969.

FREITAS, C. S.; HIGA, L. M.; SACRAMENTO, C. Q. *et al.* Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 13, n. 1, p. 1-22, 2019.

GALLER, R.; PUGACHEV, K. V.; SANTOS, C. L. S. *et al.* Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology*, v. 290, n. 2, p. 309-319, 2001.

HOLZMANN, I.; AGOSTINI, I.; ARETA, J. I. *et al.* Impact of yellow fever outbreaks on two Howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *American Journal of Primatology*, v. 72, p. 475-480, 2010.

HUDSON, N. Paul. The pathology of experimental yellow fever in the Macacus rhesus: I. Gross pathology. *The American Journal of Pathology*, v. 4, n. 5, p. 395-405, 1928a.

HUDSON, N. Paul. The pathology of experimental yellow fever in the Macacus rhesus: II. Microscopic pathology. *The American Journal of Pathology*, v. 4, n. 5, p. 407-18, 1928b.

HUDSON, N. Paul. The pathology of experimental yellow fever in the Macacus rhesus: III. Comparison with the pathology of yellow fever in man. *The American Journal of Pathology*, v. 4, n. 5, p. 419-429, 1928c.

JULANDER, J. G. Animal models of yellow fever and their application in clinical research. *Current opinion in virology*, v. 18, p. 64-69, 2016.

LITVOC, M. N.; NOVAES, C. T. G.; LOPES, M. I. B. F. Yellow Fever. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 64, n. 2, p. 106-113, 2018.

- MARTIN, M.; TSAI, T. F.; CROPP, B. *et al.* Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. *The Lancet*, v. 358, n. 9276, p. 98-104, 2001.
- MENDES, É. A.; PILGER, D. R. B.; NASTRI, A. C. S. S. *et al.* Sofosbuvir inhibits yellow fever virus in vitro and in patients with acute liver failure. *Annals of Hepatology*, v. 18, n. 6, p. 816-824, 2019.
- MONATH, T. P.; BALLINGER, M. E.; MILLER, B. R. *et al.* Detection of yellow fever viral RNA by nucleic acid hybridization and viral antigen by immunocytochemistry in fixed human liver. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 40, n. 6, p. 663-668, 1989.
- MONATH, T. P. Yellow fever: an update. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 1, n. 1, p. 11-20, 2001.
- MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. *Journal of Clinical Virology*, v. 64, p. 160-173, 2015.
- MONDET, B.; VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, A. P. A. T. *et al.* Isolation of yellow fever virus from nulliparous *Haemagogus (Haemagogus) janthinomys* in eastern Amazonia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v. 2, n. 1, p. 47-50, 2002.
- MORENO, E. S.; ROCCO, I. M.; BERGO, E. S. *et al.* Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 3, p. 290-296, 2011.
- MORENO, E. S.; SPINOLA, R.; TENGAN, C. H. *et al.* Yellow fever epizootics in non-human primates, São Paulo state, Brazil, 2008-2009. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 55, n. 1, p. 45-50, 2013.
- MUTEBI, J.; WANG, H.; LI, L. *et al.* Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *Journal of Virology*, v. 75, n. 15, p. 6999-7008, 2001.
- PAULES, C. I.; FAUCI, A. S. Yellow fever—once again on the radar screen in the Americas. *New England Journal of Medicine*, v. 376, n. 15, p. 1397-1399, 2017.
- QUARESMA, J. A. S.; PAGLIARI, C.; MEDEIROS, D. B. A. *et al.* Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Reviews in Medical Virology*, v. 23, n. 5, p. 305-318, 2013.
- RAWLINS, S. C.; HULL, B.; CHADEE, D. D.; *et al.* Sylvatic yellow fever activity in Trinidad, 1988–1989. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 84, n. 1, p. 142-143, 1990.

- REED, W.; CARROLL, J. A. S.; AGRAMONTE, A.. The etiology of yellow fever.: an additional note. *Journal of the American Medical Association*, v. 36, n. 7, p. 431-440, 1901.
- ROMANO, A. P. M. Febre Amarela. In.: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. 2. ed. São Paulo : Roca , 2014
- SONG, A. T. W.; ABDALA, E.; MARTINO, R. B. *et al.* Liver Transplantation for Fulminant Hepatitis Attributed to Yellow Fever. *Hepatology*, v. 69, n. 3, p. 1349-1352, 2019.
- SOPER, Fred L. The newer epidemiology of yellow fever. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, v. 27, n. 1, p. 1-14, 1937.
- STAPLES, J. E.; MONATH, T. P. Yellow fever: 100 years of discovery. *Journal of The American Medical Association*, v. 300, n. 8, p. 960-962, 2008.
- STAPLES, J. E.; BOCCHINI, J. A.; RUBIN, L. *et al.* Yellow fever vaccine booster doses: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 64, n. 23, p. 647, 2015.
- STOKES, A.; BAUER, J. H.; HUDSON, N. P. The transmission of yellow fever to macacus rhesus: preliminary note. *Journal of the American Medical Association*, v. 90, n. 4, p. 253-254, 1928.
- TESH, R. B.; GUZMAN, H.; ROSA, A. P. A. T. *et al.* Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical and immunologic studies. *Journal of Infectious Diseases*, v. 183, n. 10, p. 1431-1436, 2001.
- TIGERTT, W. D.; BERGE, T. O.; GOCHENOUR, W. S. *et al.* Section of biological and medical sciences: Experimental yellow fever. *Trans. New York Acad. Sci.*, v. 22, n. 5, p. 323-333, 1960.
- VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.
- VASCONCELOS, P. F. C.; LUNA, E. J.; GALLER, R. *et al.* Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *The Lancet*, v. 358, n. 9276, p. 91-97, 2001.
- VIEIRA, V.; PACHECO, L.; DEMETRIO, L. *et al.* Liver Transplantation for Acute Liver Failure due to Yellow Fever: A Case Report. *Transplantation Proceedings*, v. 51, n. 5, p. 1625-1628, 2019.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and control of yellow fever in Africa, 1986. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/39154>>. Acesso em 06 jan, 2020

WORDL HEALTH ORGANIZATION. Yellow fever vaccine: WHO position on the use of fractional doses–June 2017–. *Weekly Epidemiological Record*, v. 92, n. 25, p. 345-350, 2017.

XIAO, S.; ZHANG, H.; GUZMAN, H. *et al.* Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *Journal of Infectious Diseases.*, v. 183, n. 10, p. 1437-1444, 2001.

APÊNDICE 1

Critérios de escore histopatológico para infecção pela Febre Amarela no fígado, rim, baço, coração, pulmão e encéfalo.

Lesão	Escore	Critério
Fígado		
Necrose/apoptose	0	Ausente
	1	Discreta, hepatócitos individuais
	2	Moderada, restrita a região mediozonal
	3	Moderada a intensa, acometendo a região mediozonal e parcialmente as outras zonas.
	4	Intensa, apenas alguns hepatócitos normais nas zonas periportal e centrolobular.
Infiltrado linfohistiocítico	0	Ausente
	1	Discreto, focal ou multifocal.
	2	Moderado, multifocal.
	3	Intenso, multifocal.
Infiltrado neutrofílico	0	Ausente
	1	Discreto, focal ou multifocal.
	2	Moderado, multifocal.
	3	Intenso, multifocal.
Lipidose	0	Ausente
	1	Menos de 30% dos hepatócitos.
	2	30 a 70% dos hepatócitos.
	3	Mais de 70% dos hepatócitos
Glicogenose	0	Ausente
	1	Menos de 30% dos hepatócitos.
	2	30 a 70% dos hepatócitos.
	3	Mais de 70% dos hepatócitos
Pigmento intracitoplasmático	0	Ausente
	1	Presente
Rim		

Necrose tubular	0	Ausente
	1	Túbulos isolados, focal ou multifocal.
	2	Grupos discretos ou moderados de túbulos, multifocal.
	3	Grupos moderados a intensos de túbulos, coalescente a difuso.
Degeneração tubular	0	Ausente
	1	Túbulos isolados, focal ou multifocal.
	2	Grupos discretos ou moderados de túbulos, multifocal.
	3	Grupos moderados a intensos de túbulos, coalescente a difuso.
Pigmento intracitoplasmático	0	Ausente
	1	Túbulos isolados, focal ou multifocal.
	2	Grupos discretos ou moderados de túbulos, multifocal.
	3	Grupos moderados a intensos de túbulos, coalescente a difuso.
Cilindros hialinos	0	Ausente
	1	Presente
Infiltrado intersticial linfohistiocítico	0	Ausente
	1	Discreto, focal ou multifocal.
	2	Moderato, multifocal.
	3	Intenso, multifocal.
Infiltrado intersticial neutrofílico	0	Ausente
	1	Discreto, focal ou multifocal.
	2	Moderato, multifocal.
	3	Intenso, multifocal.
Glomerulopatia	0	Ausente
	1	Menos de 30% dos glomérulos
	2	30 a 70% dos glomérulos
	3	Mais de 70% dos glomérulos
Baço		
Hiperplasia linfoide	0	Ausente

	1	Discreta
	2	Moderada
	3	Intensa
Depleção linfoide	0	Ausente
	1	Discreta
	2	Moderada
	3	Intensa
Congestão	0	Ausente
	1	Presente
Coração		
Necrose	0	Ausente
	1	Discreto, focal ou multifocal.
	2	Moderado, multifocal.
	3	Moderado a intenso, coalescente a difuso.
Fibrose	0	Ausente
	1	Discreto, focal ou multifocal.
	2	Moderado, multifocal.
	3	Moderado a intenso, coalescente a difuso.
Infiltrado linfohistiocítico	0	Ausente
	1	Discreto, focal ou multifocal.
	2	Moderato, multifocal.
	3	Intenso, multifocal ou coalescente.
Pulmão		
Congestão	0	Ausente
	1	Presente
Hemorragia	0	Ausente
	1	Menos de 30% dos alvéolos
	2	30 a 70% dos alvéolos.
	3	Mais de 70% dos alvéolos.
Edema	0	Ausente
	1	Menos de 30% dos alvéolos
	2	30 a 70% dos alvéolos.

	3	Mais de 70% dos alvéolos.
Pneumonia intersticial	0	Ausente
	1	Discreta, focal ou multifocal.
	2	Moderada, multifocal ou coalescente.
	3	Intensa, multifocal ou difusa.
Encéfalo		
Hemorragia	0	Ausente
	1	Discreta, focal ou multifocal
	2	Moderada, multifocal
	3	Intensa, focal, multifocal ou difusa.
Edema	0	Ausente
	1	Presente
Meningite linfocitocítica	0	Ausente
	1	Discreta, focal ou multifocal
	2	Moderada, multifocal
	3	Intensa, focal, multifocal ou difusa.
Encefalite linfocitocítica	0	Ausente
	1	Discreta, focal ou multifocal
	2	Moderada, multifocal
	3	Intensa, focal, multifocal ou difusa.