

SARA ARAUJO PEREIRA

**Desenvolvimento de modelo experimental de infecção pelo
vírus da dengue em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

SARA ARAUJO PEREIRA

**Desenvolvimento de modelo experimental de infecção pelo
vírus da dengue em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza
Ferreira

Versão Original.

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Araujo Pereira, Sara
Desenvolvimento de modelo experimental de
infecção pelo vírus da dengue em camundongos / Sara
Araujo Pereira; orientador Luís Carlos de Souza
Ferreira. -- São Paulo, 2017.
68 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Modelo animal. 2. Dengue. 3. Infecção viral.
4. Vias alternativas de inoculação. 5. Flavivirus.
I. de Souza Ferreira, Luís Carlos, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Sara Araujo Pereira

Título da Desenvolvimento de modelo experimental de infecção pelo vírus da dengue em camundongos.

Orientador (a): Prof Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado (a) **Reprovado (a)**

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **120** nas fls. **24** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Luis Carlos de Souza Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Desenvolvimento de modelos experimentais de infecção em camundongos pelo vírus dengue capazes de reproduzir a doença vista em humanos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Sara Araujo Pereira, Lennon Pereira, Denicar Lina Nascimento Fabris, Rubens Prince dos Santos Alves**, Iniciação Científica **Robert Andreato Santos**, Pós-Doutorando **Jaime Henrique Amorim**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **10.11.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 13 de novembro de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.112/2016

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **120/2014/CEUA**, aprovado em 10/11/2014, informo que o título do projeto de pesquisa da aluna **Sara Araújo Pereira** foi alterado para "**Desenvolvimento de modelo experimental de infecção pelo vírus dengue em camundongos**" em atendimento às sugestões da banca durante o exame de qualificação, sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 24 de outubro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho

**À minha mãe, à minha avó e minha irmã por
toda compreensão, dedicação, apoio e carinho.**

**Ao Diego, meu amor por todo apoio,
companheirismo, amor, carinho e dedicação.**

E aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de muito trabalho, esforço e dedicação não apenas por mim, mas também por muitas parcerias e colaborações. Meu agradecimento sincero:

Ao Prof^o Dr. Luís Carlos pela orientação, pelos votos de confiança e ensinamentos, que possibilitaram o desenvolvimento do trabalho.

Ao pesquisador Dr. Jaime Henrique Amorim, pelos ensinamentos teórico-práticos básicos necessários para o início do trabalho, pelo apoio à ideia inicial do trabalho e auxílio para que ganhasse forma.

À colaboração da pesquisadora Dra. Camila Romano e ao Felipe Scassi Salvador pelas ideias e discussão das mesmas, pelo auxílio, pela determinação e dedicação.

À Dra. Viviane Fongaro Botosso e à Dra. Virgínia Barreto Moreira (Butantã) pelo auxílio na obtenção de camundongos.

À equipe e ao Prof^o Edison Durigon, à pesquisadora Daniele Bruna Leal de Oliveira (Dani Durigon), ao técnico de laboratório Luciano Matsumiya Thomazelli e ao aluno de iniciação científica Flávio Mesquita pela colaboração, por me receberem de braços abertos em seu laboratório, por disponibilizarem do tempo e do laboratório onde parte dos experimentos foram feitos, pelos ensinamentos, pela compreensão, paciência, dedicação e momentos de descontração.

À professora Rita pelo voto de confiança ao abrir as portas do laboratório para mim.

Aos amigos e técnicos do LDV: Eduardo Gimenes e Carolina Berteli, pela amizade e por sempre mais do que auxiliarem no que fosse preciso e da melhor forma possível.

Aos colegas e aos amigos do LDV: Naína, Mônica, Denicar, Eduardo, Lennon, Natiely, Mari Cintra, Éwerton, Gisela, Mari Diniz, Robert e Rúbens por tudo: paciência, conselhos, auxílio, discussões, sugestões, pelos momentos de descontração, pelos cafés e lanches. Obrigada pessoal, sem a ajuda de vocês esse trabalho seria difícil.

Ao apoio Financeiro da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

A todo o corpo técnico dos biotérios do Departamento de Parasitologia, Daniele, Juliane, Anderson e Jonatas e em especial aos Seu Carlos e ao Marco do Biotério do Departamento de Microbiologia pelo extremo cuidado e dedicação com os animais, assim como no auxílio e nas dúvidas.

À minha psicóloga Danielle Siciliano Montalto pela dedicação, atenção e auxílio psicológico nos momentos complicados.

Às mulheres da minha vida minha mãe-pai Neri, minha irmã-mãe Gisele, minha tia Dília por toda compreensão, pelos incentivos, carinho, atenção e paciência. Amo todas vocês.

À minha grande amiga Karina pela amizade sincera, duradoura, pelos conselhos, sugestões, pelos inúmeros momentos de gargalhas contínuas e pelos momentos difíceis. Jacu, amo você.

Ao meu melhor amigo, meu companheiro, meu confidente, meu maior incentivador e crítico, ao namorado Diego por toda a paciência, compreensão, pelos conselhos, gargalhadas, pelo carinho, atenção e dedicação. MUITÍSSIMO obrigada por tudo que tem me proporcionado nesses 9 anos, obrigada pelos votos de confiança, por ter me dado apoio inicial e por todo o apoio moral e incentivo para eu chegar até aqui e conseguir concluir mais essa etapa em minha vida. Amo-te demais.

À minha sogra Eliane e a D. Maria por me receberem inúmeras vezes em suas casas com confiança, apoio, compreensão e incentivo. Muito obrigada!

Aos meus avós Divina e Mathuzalem por absolutamente tudo que me ensinaram sobre honestidade, justiça; por sempre me mostrarem que bondade e alegria devem existir independente dos momentos que estivermos passando e da forma como nos tratam. Por me ensinarem o valor da FAMÍLIA na vida de uma pessoa. Ao meu avô por ensinar que o riso mesmo de suas piadas já velinhas compensa só para vê-lo retribuindo ao sorriso e para fazer com que se sentisse amado sempre; pelas brincadeiras, pela imensa paciência nas tentativas de ensinar matemática. À minha avó também pela paciência imensa, pela compreensão sobretudo no momento mais difícil pelo qual a família passou e à ambos por me mostrarem como vive um exemplo de casal que acima de tudo se respeitava

mutuamente: o espaço, a liberdade, o momento, os gostos um do outro. AMO-OS
muitíssimo.

“A gente passa a entender melhor a vida,
Quando encontra um verdadeiro amor
Cada escolha uma renúncia, isso é a vida”

CBJ

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE 4), no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

PEREIRA SA. **Desenvolvimento de modelo experimental de infecção pelo vírus da dengue em camundongos.** 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

A dengue é doença causada pelo vírus dengue (DENV), que acomete cerca de 390 milhões de pessoas todos os anos no mundo, e representa uma ameaça à saúde pública mundial. Até o momento não se dispõe de tratamento específico e vacinas ainda não estão disponibilizadas para a maior parte da população. Um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de vacinas ou mesmo uma melhor compreensão da biologia do vírus é a falta de modelos animais capazes de mimetizar a doença como vista em humanos. Nesta tese tivemos como principal objetivo trabalhar na busca de modelos alternativos de infecção com um isolado clínico (JHA1) de dengue sorotipo 2 (DENV2) descrito previamente como capaz de infectar e matar camundongos imonocompetentes após administração pela via intracraniana. Foram testadas duas vias parenterais de inoculação do vírus (intraperitoneal e intravenosa) em camundongos adultos imunocompetentes. Também avaliamos um modelo de infecção em camundongos C57BL/6 inoculados pela via intracraniana. Por fim, foram feitas tentativas de mapeamento de mutações envolvidas com a neurovirulência do isolado JHA1 em camundongos imunocompetentes. Os resultados obtidos representam uma contribuição para a caracterização do isolado JHA1 e para a busca de modelos experimentais alternativos de DENV.

Palavras-chave: modelo animal, dengue, infecção viral, vias alternativas de inoculação, Flavivirus.

ABSTRACT

PEREIRA SA. **Development of an experimental model of dengue virus infection in mice.** 2017. 96 p. Dissertation (Masters thesis Parasitology) - São Paulo: Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, 2017.

Dengue fever is a illness caused by the dengue virus (DENV), which affects roughly 390 million peoples every year in the world, representing a worldwide public health threat. So far, there is no specific treatments and vaccines widely available for the population. One of the most relevant drawbacks for the development of vaccines or either for a better understanding of the virus biology is the lack of animal models capable to reproduce the disease symptoms as seen in humans. In the presente thesis our main objective was the search of alternative infection models with a clinical isolate (JHA1) of serotype 2 dengue virus (DENV2), previously described as capable to infect and kill immunocompetent mice after intracranial administration. We tested two parenteral inoculation routes (intraperitoneal and intravenous) in immunocompetent adult mice. We also evaluated the infection model in C57BL/6 mice inoculated by the intracranial route. Finally, we carried out attempts to identify mutations related with the neurovirulence of the JHA1 isolate in immunocompetent mice. The results represent a contribution for the characterization of the JHA1 isolate and shall add to the search of DENV alternative experimental models.

Keywords: animal model, dengue, viral infection, alternative routes of inoculation, Flavivirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Adaptação viral após passagens sequenciais em camundongos.....	25
Figura 2 – Árvore filogenética do DENV sorotipo 2 JHA1.....	29
Figura 3 – Esquema representativo da estratégia experimental utilizada na análise da infecção de camundongos neonatos da linhagem BALB/c pela via i.p. com a cepa JHA1 de DENV-2.....	34
Figura 4 – Inoculação em camundongos neonatos da linhagem BALB/c pela via i.p. com o isolado JHA1.....	41
Figura 5 – Análise de sobrevivência, variação de peso e temperatura corporal em camundongos adultos BALB/c inoculados pela via i.v. com isolado JHA1.....	43
Figura 6 – Análise de parâmetros hematológicos em camundongos BALB/c inoculados pela via i.v. com JHA1.....	44
Figura 7 – Análise de alterações metabólicas desencadeada em camundongos adultos BALB/c inoculados pela via i.v. com o JHA1.....	45
Figura 8 – Avaliação de sobrevivência e sinais de morbidade e camundongos C57BL/6 após a inoculação do JHA1.....	47
Figura 9 – Análise de alterações hematológicas observadas em camundongos adultos C57BL/6 inoculados pela via i.c. com JHA1.....	48
Figura 10 – Análise indireta da ocorrência de lesões teciduais em camundongos adultos C57BL/6 inoculados pela via i.c. com o JHA1.....	49
Figura 11 – Detecção do genoma viral por PCR em tempo real nos órgãos de C57BL/6 adultos inoculados com o JHA1.....	50
Figura 12 – Esquema da estratégia experimental utilizada para a identificação de possíveis mutações associadas a neurovirulência do JHA1.....	51
Figura 13 – Análise de sobrevivência de camundongos BALB/c adultos que receberam a cepa parental e a cepa atenuada p.29 cél.....	51
Figura 14 – Análise de sobrevivência de camundongos BALB/c adultos inoculados pela via i.c. com derivados do JHA1.....	52
Figura 15 – Detecção de mutações em aminoácidos nos derivados de JHA1 após 29 passagens em cultura de células e uma passagem em cérebro de camundongos neonatos.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos modelos mais importantes de infecção por DENV.....	27
Tabela 2 - Oligonucleotídeos e sondas utilizados para amplificação dos genomas virais de DENV.....	36
Tabela 3 - Oligonucleotídeos e sondas utilizados para amplificação dos genomas virais de DENV.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	alanina aminotransferase
APCs	células apresentadoras de antígeno
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
AST	aspartato aminotransferase
BLT	<i>cells bone marrow, thymus and liver</i> (células de medula óssea, timo ou fígado)
C6/36	células de mosquito gênero <i>Aedes albopictus</i>
CD	células dendríticas
cDNA	DNA complementar
DENV	<i>Dengue virus</i> (vírus dengue)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
E	proteína do envelope
HSC	<i>humanized hematopoietic stem cells</i> (células hematopoiéticas humanizadas)
hu-mice	<i>humanized mice</i> (camundongo humanizado)
i.c.	intracraniana
i.d.	intradérmica
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenosa
IFN- α	<i>interferon alpha</i> (interferon alfa)
IFN- β	interferon beta
IFN- γ	<i>interferon gamma</i> (interferon gama)
Ile	isoleucina
LDH	lactato desidrogenase
Leu	leucina
Met	metionina
NOD	<i>Nonobese diabetic</i> (diabéticos não obesos)

NS	<i>nonstructural protein</i> (proteínas não estruturais)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
prM	proteína precursora de membrana
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i> (imunodeficiência severa combinada)
Ser	serina
Tre	treonina
UFP	Unidades Formadoras de Placas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVO.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Obtenção da cepa viral JHA1.....	31
3.2 Titulação do JHA1 obtido do sobrenadante de células C6/36 infectadas.....	31
3.3 Obtenção dos camundongos.....	32
<i>3.3.1 Manutenção dos camundongos C57BL/6 no biotério de criação e experimentação do Departamento de Parasitologia.....</i>	<i>32</i>
<i>3.3.2 Manutenção dos camundongos BALB/c no biotério do Departamento de Microbiologia do ICB.....</i>	<i>32</i>
<i>3.3.3 Inoculação em camundongos BALB/c neonatos pela via i.p.....</i>	<i>33</i>
<i>3.3.4 Acompanhamento de peso, temperatura e morbidade dos camundongos adultos inoculados com a cepa JHA1.....</i>	<i>34</i>
<i>3.3.5 Inoculação em camundongos adultos BALB/c com DENV JHA1 pela via i.v.....</i>	<i>35</i>
<i>3.3.6 Inoculação em camundongos adultos C57BL/6 pela via i.c. com o isolado JHA1.....</i>	<i>35</i>
<i>3.3.6.1 Extração de RNA total.....</i>	<i>35</i>
<i>3.3.6.2 Iniciadores utilizados no PCR em tempo real.....</i>	<i>36</i>
<i>3.3.6.3 Quantificação em tempo real-PCR.....</i>	<i>36</i>
3.4 Atenuação do isolado JHA, reversão da neurovirulência e análise das alterações genéticas por sequenciamento.....	37
<i>3.4.1 Atenuação da cepa JHA1 por passagens sequenciais em células de inseto.....</i>	<i>37</i>
<i>3.4.2 Inoculação em camundongos neonatos BALB/c pela via i.c. com vírus JHA1 após atenuação em células C6/36.....</i>	<i>38</i>
<i>3.4.3 Análise de sequenciamento genético da cepa atenuada e readaptada à neurovirulência.....</i>	<i>38</i>
<i>3.4.3.1 Extração e quantificação por PCR em tempo real.....</i>	<i>38</i>
<i>3.4.3.2 Sequenciamento.....</i>	<i>39</i>

4 RESULTADOS	40
4.1 BLOCO1: Inoculação de isolado clínico JHA1 em camundongos neonatos da linhagem BALB/c	40
4.1.1 Inoculação em camundongos BALB/c neonatos pela via i.p.....	40
4.1.2 Inoculação do JHA1 em camundongos BALB/c adultos pela via i.v.....	42
4.2 BLOCO 2: Inoculação em camundongos adultos C57BL/6 com o isolado clínico JHA1	46
4.2.1 Infecção de camundongos C57BL/6 com DENV2 JHA1 adultos pela via i.c.....	47
4.3 BLOCO 3: Análise de mutações genéticas antes e após atenuação e reversão da neurovirulência do isolado clínico JHA1 de DENV2	50
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	66
A – Complete genoma sequence of na atypical dengue virus serotype 2 lineage isolated in Brazil	67
B – Antibodies are not required to a protective immune response against dengue virus elicited in mouse encephalitis model	68

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma infecção aguda causada pelo vírus dengue (DENV), um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* que apresenta quatro diferentes sorotipos (DENV-1 a DENV-4) capazes de infectar e causar doença em humanos (GUBLER, 1998a; HENCHAL; PUTNAK, 1990b; LEONG et al., 2007; WHITEHEAD et al., 2007). O DENV é transmitido aos humanos através da picada e repasto sanguíneo de fêmeas do mosquito do gênero *Aedes sp.* (principalmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* - principais espécies transmissoras) infectadas (GUBLER, 1998a; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; WHITEHEAD et al., 2007). Um indivíduo após ser infectado por um dos 4 sorotipos, permanece protegido contra esse sorotipo específico, mas não dos demais, podendo desenvolver as formas mais graves da doença (CHOKEPHAIBULKIT; PERNG, 2013; LEONG et al., 2007; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; SIMMONS et al., 1998).

A dengue é uma doença de grande relevância epidemiológica, que atinge cerca de 390 milhões de pessoas todos os anos principalmente em regiões tropicais e subtropicais (CHOKEPHAIBULKIT; PERNG, 2013; GUBLER, 1998b; HENCHAL; PUTNAK, 1990b; NOISAKRAN; PERNG, 2008; PUCCIONI-SOHLER; ROSADAS, 2015; WU et al., 1995; ZOMPI; HARRIS, 2012). De acordo com o boletim epidemiológico de dengue no Brasil, de janeiro a setembro de 2016, foram registrados 639 casos de dengue grave e 6.253 casos de dengue com sinais de alerta e confirmados 419 óbitos no país. A região Sudeste do país foi líder em número de casos registrados de dengue grave e dengue com sinais de alerta, com um total de 349 e 2.917 respectivamente (VIGILÂNCIA, 2016). Portanto, a dengue é considerada atualmente uma emergência em saúde pública no Brasil e no mundo.

A replicação do DENV no organismo humano começa com a entrada do vírus pela via intradérmica (i.d.) onde se liga a células dendríticas (CD) presentes na pele, sendo posteriormente drenados a linfonodos próximos à região da picada do inseto. O vírus se replica de forma exacerbada nas CDs, assim como em outras células apresentadoras de antígenos (APC), até que se rompam e liberem

partículas virais maduras na corrente sanguínea – etapa denominada de viremia (BENTE et al., 2005; GUZMAN et al., 2010; JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). Após a queda do DENV na corrente sanguínea, tem-se início de febre no indivíduo infectado. O DENV pode se ligar a diferentes células de diferentes órgãos, onde se replica e causa danos hepáticos, no baço, nos pulmões e até mesmo encefalite após atravessar a barreira hematoencefálica (GUBLER, 1998b; GUZMAN et al., 2010; HENCHAL; PUTNAK, 1990a; LEONG et al., 2007).

Indivíduos infectados pelo DENV poderão ser assintomático ou apresentar os sintomas clássicos ou graves da doença (BÄCK; LUNDKVIST, 2013; BENTE et al., 2005; WHITEHEAD et al., 2007; ZOMPI; HARRIS, 2012). Os sintomas clássicos da doença são: febre aguda por período de até 7 dias, dores de cabeça, dores atrás dos olhos, dores musculares e nas articulações, náuseas e erupção cutânea. (BÄCK; LUNDKVIST, 2013; ENDY, 2014; GUABIRABA, 2013; HENCHAL; PUTNAK, 1990b). Na dengue com sinais de alarme, o indivíduo apresentará além dos sintomas clássicos: dor abdominal intensa e contínua, vômito persistente, dificuldade respiratória e hemorragia de mucosa. Os sinais da dengue grave são caracterizados por hemorragia grave, hipovolemia decorrente do extravasamento de plasma, choque e comprometimento grave dos órgãos podendo chegar a óbito (BÄCK; LUNDKVIST, 2013; BIZZARRO et al., 2013; COSTA et al., 2012; MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013; WHITEHEAD et al., 2007; ZOMPI; HARRIS, 2012). A dengue com sinais de alarme e a dengue grave estão associados à infecção secundária com sorotipo heterólogo, ou seja, após a reexposição ao DENV com sorotipo diferente da primeira infecção, o indivíduo poderá apresentar as formas mais graves da dengue (BARROS et al., 2015; CHAN et al., 2015; CLAPHAM et al., 2016; WATANABE et al., 2015).

Além dos sinais clínicos relatados, observa-se também o aumento dos níveis das aminotransferases (AST e ALT), bem como de lactato desidrogenase (LDH), enzimas marcadoras de danos hepáticos e tecidual, além de plaquetopenia e leucopenia (baixa contagem de plaquetas e leucócitos) e hematócrito elevado em exames sanguíneos (AMORIM et al., 2012; BLANEY et al., 2002; CISALPINO et al., 2012; ENDY, 2014; GUABIRABA, 2013; LARSEN; WHITEHEAD; DURBIN,

2015; LEONG et al., 2007; MORRISON; GARCÍA-SASTRE, 2014). Assim sendo, uma vez que não há tratamento específico para a doença, recomenda-se repouso e ingestão de muito líquido e, em casos de dengue com sinais de alerta ou dengue grave, recomenda-se a busca de auxílio médico imediata onde os cuidados para reduzir e amenizar os sintomas serão tomados, porém a principal recomendação é evitar a automedicação (Portal da Saúde SUS).

Medidas para a prevenção da doença podem ter impacto importante para a mortalidade e morbidade em diferentes populações humanas. Há duas formas de prevenção da doença, uma voltada para o controle do vetor artrópode e outra voltada para o desenvolvimento de vacinas. Atualmente a disponibilização de uma vacina para uso em seres humanos trouxe perspectivas importantes para o controle da doença (PLOTKIN, 2014).

As principais estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra o DENV se baseiam em resultados pré-clínicos e, mais recentemente, clínicos. Vacinas testadas em condições pré-clínicas incluem vacinas de DNA, vacinas baseadas em proteínas recombinantes do vírus, vírus atenuados ou inativados ou vírus quiméricos (CHOKEPHAIBULKIT; PERNG, 2013; MURRELL; WU; BUTLER, 2011).

As vacinas testadas em humanos (ou seja, que passaram da fase pré-clínica para fase clínica) incluem vacinas baseadas em vírus vivos atenuados e vírus quiméricos recombinantes. As vacinas de vírus vivos atenuados mimetizam de forma mais próxima à infecção natural pelo DENV. Duas candidatas vacinais tetravalentes baseadas no método de atenuação foram avaliadas. Uma delas, desenvolvida pela GSK (GlaxoSmithKline) e WRAIR (Water Reed Army Institute of Research), baseou-se na atenuação por passagem seriada em cultura de células e, embora tenha apresentado boa imunogenicidade, exibiu problemas na atenuação dos DENV1 e 4 (EDELMAN, 2007). A outra vacina, desenvolvida pelo NIAID (Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas) em colaboração com o Instituto Butantã, encontra-se em testes clínicos fase III no Brasil. Essa vacina foi obtida após deleções nas regiões não traduzidas (UTRs) para atenuação dos vírus vacinais e, mostrou-se imunogênica, segura e capaz de induzir imunidade protetora em seres humanos (KIRKPATRICK et al., 2015).

A estratégia vacinal em estágio mais avançado para uso em seres humanos, baseia-se em uma formulação tetravalente constituída de vírus quiméricos recombinantes. Denominada CYD-TDV (do inglês Chimeric Yellow Fever Virus–DENV Tetravalent Dengue Vaccine), a vacina é produzida pela empresa Sanofi Pasteur e utiliza vírus atenuados quiméricos, em que os genes que codificam proteínas prM e E do DENV substituem os correspondentes genes do vírus da febre amarela (GUY et al., 2011). Embora a vacina tenha passado por diversos testes de fase IIb e III há questionamentos sobre a eficácia e segurança em função da proteção parcial desequilibrada entre os 4 sorotipos (CAPEDING et al., 2014; COSTA et al., 2014; GUY et al., 2011; SABCHAREON et al., [s.d.]). Embora os estudos relacionados a vacinas contra o DENV tenham avançado consideravelmente, pesquisas experimentais devem continuar em busca de formulações mais seguras e eficazes contra os 4 sorotipos causadores da doença.

O Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) da USP vem atuando há vários anos no desenvolvimento de vacinas experimentais contra o DENV. O trabalho feito pelo grupo tem focado em proteínas recombinantes (vacinas de subunidades) e se baseou, até o momento, nas proteínas NS1 e NS5. Apesar dos resultados promissores, há necessidade de mais estudos e testes com diferentes adjuvantes para a obtenção de resposta imunológicas protetoras mais robustas (PRINCE et al., 2016; SANTOS, 2012).

Um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de vacinas é a falta de um modelo adequado de infecção em animais capaz de reproduzir os sinais clínicos-laboratoriais e respostas imunológicas semelhantes às observadas em humanos (AN et al., 1999; BENTE; RICO-HESSE, 2006; CISALPINO et al., 2012).

A patologia do dengue vem sendo estudada e testada em diferentes modelos animais desde 1902, mas somente a partir de 1924, Harris e Duval conseguiram observar alguns sinais clínicos, como aumento da temperatura corporal, redução da quantidade de leucócitos e morte em cobaias que foram inoculados com DENV obtido a partir do soro de pacientes acometidos pela infecção (DUVAL; HARRIS, 1924). No período de 1945 a 1952, dois diferentes grupos de pesquisadores relataram tentativas de infectar camundongos com DENV. Ambos demonstraram o envolvimento do sistema nervoso na infecção por DENV. Hotta e Sabin

basearam-se em isolados virais adaptados, obtidos após passagens sequenciais em cérebro de camundongos neonatos, que mostraram-se capazes de provocar sinais de infecção, como danos no cérebro e nos pulmões, hemorragia e viremia (HOTTA, 1952; SABIN; SCHLESINGER, 1945). Esses resultados lançaram a base de um modelo experimental para o DENV baseado em pequenos animais que mimetizam pelo menos parcialmente, a doença em humanos.

O método de adaptação de cepas virais em camundongos neonatos visa obter uma cepa capaz de infectar e causar doença ou morte em camundongos imunocompetentes adultos (SARATHY et al., 2015b). Para isso é necessária a administração da cepa viral pela via intracraniana (i.c.) em camundongos neonatos (com 2-3 dias de vida), já que não possuem um sistema imunológico totalmente desenvolvido. A cepa é recuperada a partir dos animais infectados e repete-se o ciclo até que seja possível observar um isolado capaz de induzir morte em camundongos adultos inoculados pela via i.c. Este processo, promove mutações adaptativas na cepa, de modo a selecionar partículas infectivas para o novo hospedeiro (Figura 1). O processo de adaptação de cepas virais é importante para estudos voltados à patogênese do vírus, assim como para estudos que visam avaliar respostas imunológicas desencadeadas no processo de infecção e em estudos de desenvolvimento de vacinas (AMORIM et al., 2015; BRAY et al., 1998; HOTTA, 1952; SARATHY et al., 2015b).

Ao final da década de 1970, um grupo de pesquisadores testou o DENV de diferentes sorotipos e outros flavivirus em primatas não humanos (CHATURVEDI et al., 1978). O que se observou foi que os animais foram capazes de desenvolver viremia transiente, mas não os sinais de morbidade como alteração da temperatura e/ou hemorragia normalmente observados em humanos (CHATURVEDI et al., 1978; CHATURVEDI; TANDON; MATHUR, 1977). Dados mais atuais sobre testes de infecção em macacos confirmaram que esses animais não desenvolvem sinais de doença independente da via e da quantidade de partículas virais inoculadas, comprovando a dificuldade em desenvolver um modelo de infecção em primatas (AKKINA, 2013; SARATHY et al., 2015b; SCHERER et al., 1978; ZELLWEGER; SHRESTA, 2014; ZOMPI; HARRIS, 2012). Tal dificuldade está ligada a diversos fatores como a incapacidade de cepas nativas de se replicarem em outras espécies

de mamíferos, particularmente quando administrados por vias mais próximas ao natural, e a quantidade de partículas virais empregadas na infecção (AMORIM et al., 2015; HENCHAL; PUTNAK, 1990b).

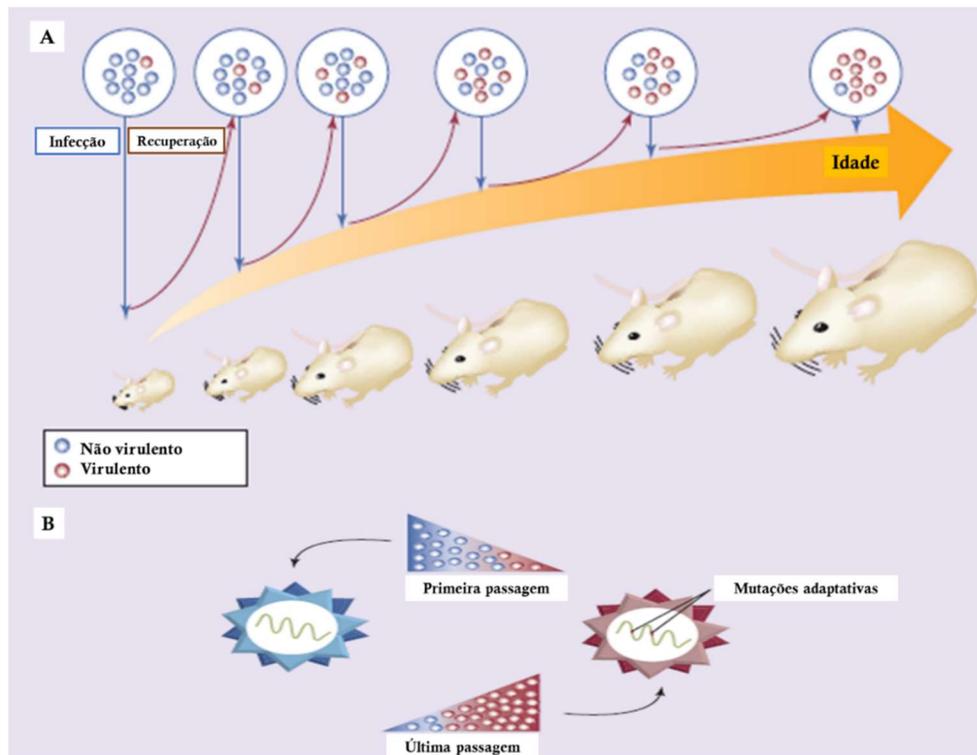


Figura 1 - Adaptação viral após passagens sequenciais em camundongos. (A) Cepa viral inoculada e recuperada de cérebro de camundongos neonatos, sendo posteriormente inoculados em camundongos mais velhos. Esse processo é repetido até que o vírus provoque letalidade em camundongos adultos. (B) Seleção de mutações adaptativas envolvidas no processo de adaptação viral ao hospedeiro, ocorre de forma que a relação vírus não virulento e virulento seja reduzido ao longo do processo. Modificada de Amorim, J. H. et al. 2015.

Devido à dificuldade em desenvolver um modelo animal de infecção por DENV, novas estratégias vêm sendo exploradas (Tabela 1). Muitos pesquisadores têm utilizado camundongos imunodeficientes como os camundongos da linhagem AG129, que possuem deficiência em receptores de interferon tipo I e II (ou seja, IFN α , β e γ). Esses camundongos possuem maior susceptibilidade à replicação viral, apresentando alta carga viral e sinais graves da dengue como trombocitopenia e aumento da permeabilidade vascular (MATHEW; TOWNSLEY; ENNIS, 2014; WILLIAMS et al., 2009). Porém, esses animais não reproduzem as respostas imunológicas observadas em indivíduos imunocompetentes, comprometendo assim a avaliação da eficácia e a segurança de candidatos vacinais

(AKKINA, 2013; AMORIM et al., 2012; ZELLWEGER; SHRESTA, 2014; ZOMPI; HARRIS, 2012).

Outras linhagens de camundongos vêm sendo utilizadas para estudos de infecção por DENV como no caso de camundongos transplantados com células ou tecidos humanos, conhecidos como camundongos humanizados (Tabela 1). Esses animais são susceptíveis à infecção e apresentam sinais da doença observada em humanos (AKKINA, 2013). Camundongos com imunodeficiência combinada grave (ou SCID, do inglês Severe combined immunodeficiency) são utilizados para o transplante de células ou tecidos humanos como células hematopoiéticas humanizadas (sigla hu-HSC, do inglês humanized hematopoietic stem cells), células de medula óssea, timo ou fígado (hu-BLT, do inglês humanized mice-bone marrow, thymus and liver) (AMORIM et al., 2015; CHAN et al., 2015; SARATHY et al., 2015a). Também são empregados camundongos diabéticos não obesos – NOD (do inglês Nonobese diabetic) que podem ser utilizados em estudos da patogênese de DENV e tem demonstrado capacidade de desenvolver viremia e dar sinais da doença na condição de alarme e grave (AKKINA, 2013; AMORIM et al., 2015; BENTE et al., 2005; SARATHY et al., 2015a). A linhagem NOD/SCID foi em estudos de patogênese de DENV após transmissão por *Aedes* (AMORIM et al., 2015; COX et al., 2012).

Modelos baseados em camundongos humanizados mostram-se promissores para o desenvolvimento um modelo experimental de DENV, mas necessitam de intensa mão de obra e treinamento adequado para a realização de transplantes de forma cirúrgica. Existem também dificuldades envolvendo o alto custo para obter e manter tais linhagens que exigem condições sanitárias e de ambientação especiais (AKKINA, 2013; AMORIM et al., 2015; BÄCK; LUNDKVIST, 2013; SARATHY et al., 2015b; WU et al., 1995).

Tabela 1. Resumo dos modelos mais importantes de infecção de camundongos por DENV.

Linhagem	Cepa viral	Dose viral	Via de inoculação	REFERÊNCIA
BALB/c	DENV-2 Cepa adaptada	5 DL ₅₀	Intraperitoneal	Atrasheuskaya, A.; Petzelbauer, P.; Fredeking, T. M.; Ignatyev, G. 2003
BALB/c	DENV-2 Cepa adaptada ou não adaptada	4.32 log ₁₀ UFP ou 100 TCID ₅₀	Intracraniana ou Intraperitoneal	Costa, S. M. et al. 2007
BALB/c	DENV-2 Cepa adaptada	4.32 log ₁₀	Intracraniana	Azevedo, A. S. et al. 2011
hu-PBL-SCID	DENV-1	DI	Intraperitoneal	Wu, S. J. et al. 1995
K562-SCID	DENV-2 Isolado clínico	10 ⁷ UFP	Intraperitoneal	Lin, Y. L. et al. 1998
HepG2-SCID	DENV-2 Isolado clínico	10 ⁶ UFP	Intraperitoneal	An, J.; Kimura-Kuroda, J.; Hirabayashi, Y.; Yasui, K. 1999
NOD/SCID	DENV-2 Isolado clínico	4.7 log ₁₀ UFP	Subcutânea	Bente, D. A.; Melkus, M. W.; Garcia, J. V.; Rico-Hesse, R. 2005
AG129	DENV-2 Isolado clínico	10 ² -10 ⁷ UFP	Intraperitoneal	Tan, G. K. et al. 2010
C57BL/6, IgH ^{-/-} , TNF- α ^{-/-} , A/HeJ e A/J	DENV-2 Isolado clínico	4x10 ⁷ UFP	Intradérmica	Chen, H-C et al. 2007
C57BL/6	DENV-2 Isolado clínico	4x10 ⁷ UFP	Intradérmica	Wu-Hsieh, B. A.; Yen, Y-T.; Chen, H-C. 2009
C57BL/6	DENV-1 cepa adaptada	7,2x10 ⁷ UFP	Intraperitoneal	Gonçalves, D. et al. 2012
C57BL/6	DENV-3 Isolado clínico	4x10 ² - 4x10 ⁵ UFP	Intracraniana	Ferreira, G. P.; et al. 2010
BALB/c	DENV-2 Isolado clínico	300 UFP	Intracraniana	Amorim, J. H. et al. 2012
AG129	DENV-2	7.3 log ₁₀	Intraperitoneal	Milligan, G. N. et al. 2015
AG129	DENV-3	10 ^{6.5} e 10 ^{7.5} UFF	Intraperitoneal	Sarathy, V. V. et al. 2015
BALB/c	DENV-2 cepa adaptada	40 DL ₅₀	Intracraniana	Oliveira, E. R. A. et al. 2016
BALB/c	DENV-2 Cepa adaptada	50 DL ₅₀	Intracraniana	Marcos, E. et al. 2016

LD₅₀: dose letal de 50%; UFP: Unidades Formadoras de Placa; UFF: Unidades Formadoras de Foco; TCID₅₀: 50% de dose infecciosa de cultura de tecido; DI: Dados indisponíveis

Modificada de Amorim, J. H. et al. 2015.

Camundongos imunocompetentes das linhagens BALB/c e C57BL/6 são os que apresentam respostas imunológicas completas e poderiam reproduzir de forma mais natural as condições envolvidas na infecção pelo DENV (AMORIM et al., 2015). No entanto, por apresentarem resistência à infecção por DENV, requerem administração de altas cargas virais ou o uso de cepas adaptadas inoculadas pela via i.c. desencadeando sinais de infecção raramente observados em humanos, como a paralisia de membros e danos neurológicos graves (AMORIM et al., 2012, 2015; GUABIRABA, 2013; JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013; ZELLWEGER; SHRESTA, 2014; ZOMPI; HARRIS, 2012).

Amorim e colaboradores descreveram um isolado clínico de DENV obtido a partir de soro de um paciente hospitalizado durante da fase aguda da doença (AMORIM et al., 2012). O isolado intitulado JHA1 pertence ao sorotipo de DENV2 (Figura 2) e mostrou-se capaz de induzir 100% de letalidade em camundongos BALB/c imunocompetentes adultos, após administração pela via i.c., sem a necessidade de adaptação (AMORIM et al., 2012). O JHA1 desencadeou alterações hematológicas e aumento nos níveis de enzimas hepáticas nos animais inoculados (AMORIM et al., 2012). Esses resultados indicam que o JHA1 poderia atuar como base para um modelo de infecção em camundongos imunocompetentes (AMORIM et al., 2012). No entanto, a utilização da via i.c. permanece como um obstáculo no sentido de aproximar o modelo a condições mais semelhantes àsquelas observadas em condições naturais. De fato, como ressaltado por vários autores, a busca de modelos animais mais adequados para estudos com DENV ainda é considerada uma prioridade para a área (MARCOS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; SARATHY et al., 2015a). Deste modo, a realização do presente projeto teve como objetivo inicial contribuir para a geração de dados que auxiliem no desenvolvimento de um modelo experimental de infecção em camundongos imunocompetentes por DENV, sem a necessidade de adaptação do vírus ou administração de grandes quantidades de vírus.

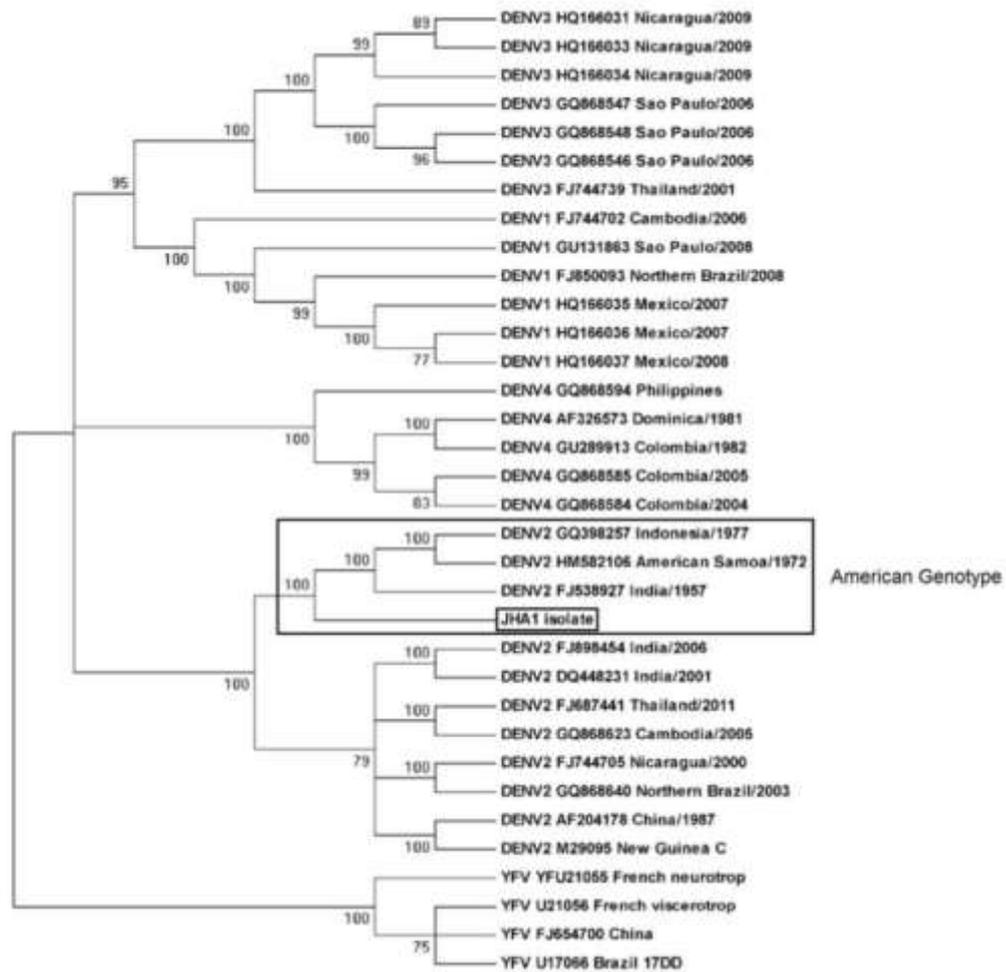


Figura 2 - Árvore filogenética do DENV sorotipo 2 JHA1. Árvore filogenética demonstrando (retângulo) que o JHA1 está agrupado no DENV-2, com base em sequências nucleotídicas da proteína EIII (proteína do Envelope – domínio III) e na proteína NS1 (não estrutural). Modificado de Amorim, J. H. et al. 2012.

2 OBJETIVOS

O presente projeto de mestrado teve como objetivo principal desenvolver modelos de infecção em camundongos imunocompetentes baseados no isolado JHA1 de DENV-2 de maneira a reproduzir sinais da doença semelhantes aos observados na infecção em humanos e permitindo a sua utilização na avaliação de candidatos vacinais. As principais etapas experimentais envolvidas na execução deste objetivo foram:

- A. Avaliar a infecção de camundongos imunocompetentes (BALB/c e C57BL/6) por diferentes vias (i.p., i.v. e i.c.) pelo ajuste de dose infectante da referida cepa viral para as diferentes vias de inoculação testadas.
- B. Determinar a dose letal para 50% dos animais (DL_{50}) para as linhagens de camundongo (BALB/c e C57BL/6) pelas vias de inoculação iv. e i.c. do JHA1;
- C. Acompanhar os sinais de morbidade (variação de peso e de temperatura) assim como as alterações hematológicas e enzimas indicadoras de danos teciduais nos animais inoculados;
- D. Estudar possíveis mutações adaptativas e/ou acumulativas no genoma viral após passagens sequenciais em células de inseto (C6-36) e em cérebro de camundongos neonatos comparando ao isolado parental, utilizando técnicas de sequenciamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da cepa viral JHA1

O isolado JHA1 de DENV-2 foi gentilmente cedido pela Dra. Camila Romano do laboratório de Virologia LIM5 do Instituto de Medicina Tropical da USP. O isolado foi obtido a partir do soro de um paciente hospitalizado em Belém – PA, que apresentava febre durante a fase aguda da doença (4º dia após o surgimento dos sintomas). A confirmação da viremia ocorreu por PCR (dados não mostrados). Para o presente trabalho, o JHA1 foi propagado por meio de cultivo em células de mosquito *Aedes albopictus* (C6/36) por 7 dias. Durante esse período foi acompanhado o efeito citopático característico de infecção por DENV e realizada a coleta de sobrenadante de cultura e a estocagem em nitrogênio líquido para posterior determinação do título viral. Ensaios para a caracterização da capacidade de infecção em modelos de camundongos foram realizados como descrito por Amorim e colaboradores (AMORIM et al., 2012).

3.2 Titulação do DENV isolado JHA1 obtido do sobrenadante de células C6/36 infectadas

As titulações virais foram realizadas por ensaio de placa (24 poços - Costar) contendo células Vero (1×10^5 /poço) e incubadas por 24 h em estufa contendo 5% CO₂ a 37 °C. Posteriormente foram adicionados 200 µL/poço das diferentes diluições do DENV JHA1 nos respectivos poços com a monocamada de células Vero. Posteriormente as placas foram incubadas por 1 h em estufa a 37 °C com 5% CO₂ para a adsorção viral. Decorrido o tempo, a mistura foi aspirada e, em seguida, foi adicionado 1 mL/poço de meio completo MEM (Embriolife) suplementado com carboximetilcelulose – CMC a 1% (Synth) acrescido com 2% de soro fetal bovino - SFB (Embriolife). As placas foram novamente levadas à estufa e incubadas por 7 dias. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e a monocamada foi fixada após adição de 200 µL/poço da solução de formaldeído a 4% por 15 min. Posteriormente, a monocamada foi lavada delicadamente com água corrente e corada com corante cristal violeta por 10 min, lavadas e deixadas para secar em temperatura ambiente.

3.3 Obtenção dos camundongos

Camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c foram manipulados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo de número 120.

3.3.1 Manutenção dos camundongos C57BL/6 no Biotério de Criação e experimentação do Departamento de Parasitologia

Camundongos machos das linhagens C57BL/6 e BALB/c com 4 semanas foram obtidos junto ao biotério de criação e experimentação do Departamento de Parasitologia (ICB II – USP) e mantidos em gaiolas convencionais com dimensões de 49 cm de comprimento x 34 cm de largura x 16 cm de altura, com substrato de pinus, água filtrada autoclavada e ração balanceada da Qiumtia AE7 irradiada. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente (entre 20 e 22 °C) com “fotoperíodo” de 12 h claro/ 12 h escuro. Os animais foram submetidos a exames sanitários a cada 3 meses de acordo com as normas da FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

3.3.2 Manutenção dos camundongos BALB/c no Biotério do Departamento de Microbiologia do ICB

Camundongos BALB/c com 4 semanas foram utilizados nos experimentos em que inoculamos vírus DENV pela via i.v. Os animais foram obtidos junto ao Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia do ICB, mantidos sob condições sanitárias controladas, variação de temperatura entre 20 °C a 24 °C e, fotoperíodo de 12 h. Os animais foram mantidos em mini isoladores de policarbonato (30 cm largura x 40 cm de comprimento x 20 cm de altura), instalados em racks ventilados. A água e a ração foram esterilizadas e oferecidas *ad libitum*. As gaiolas eram forradas com maravalha de pinus autoclavada. O controle sanitário foi realizado quatro vezes por ano, quando foram feitas avaliações microbiológicas e parasitológicas. Os neonatos foram mantidos juntos às mães até que o fim do período de amamentação em gaiolas com

microisoladores em estantes ventiladas e tanto as trocas das gaiolas quanto à manipulação para administração do vírus ou coleta dos órgãos, foram realizadas em fluxos laminares sob condições estéreis.

3.3.3 Inoculação em camundongos BALB/c neonatos pela via i.p.

Foram realizados 5 experimentos independentes com o isolado DENV JHA1 em camundongos BALB/c neonatos por esta via. Para esses experimentos, inicialmente administraram-se 10^2 ; 10^4 ou 10^5 UFP do isolado JHA1 no volume final de 70 μ L. A cada dois dias (2, 4, 6 e 8), 2 animais foram eutanasiados para coleta de órgãos (baço, cérebro, fígado e rins) (Figura 3). Os órgãos foram coletados e transferidos para meio de cultura: 1 mL de meio DMEM – para cada baço e rim e 2 mL de meio DMEM – para cada cérebro e fígado. Os órgãos foram processados com auxílio do embolo de seringas de 5 mL (BD) e transferidos para tubos de 2 mL e centrifugados a 4 °C por 5 min a 1.300 rpm. Posteriormente, os respectivos sobrenadantes foram transferidos para criotubos e armazenados em nitrogênio líquido. Para análise das amostras de soro, as amostras de sangue foram coletadas e incubadas por 30 min a 37 °C e, em seguida, submetidas à centrifugação por 30 min e 3.000 rpm. As amostras foram transferidas para tubos eppendorf devidamente identificados e armazenados à -80 °C. As amostras de soro e sobrenadante dos órgãos foram analisadas quanto à carga viral, por meio de titulação por método convencional de acordo com o protocolo descrito no item 3.2. Para análise dos sinais de morbidade (variação de peso e temperatura) e morbidade, foram administrados 10^4 e 10^7 UFP do isolado JHA1 em BALB/c neonatos, e os animais foram acompanhados pelo período de 21 dias.

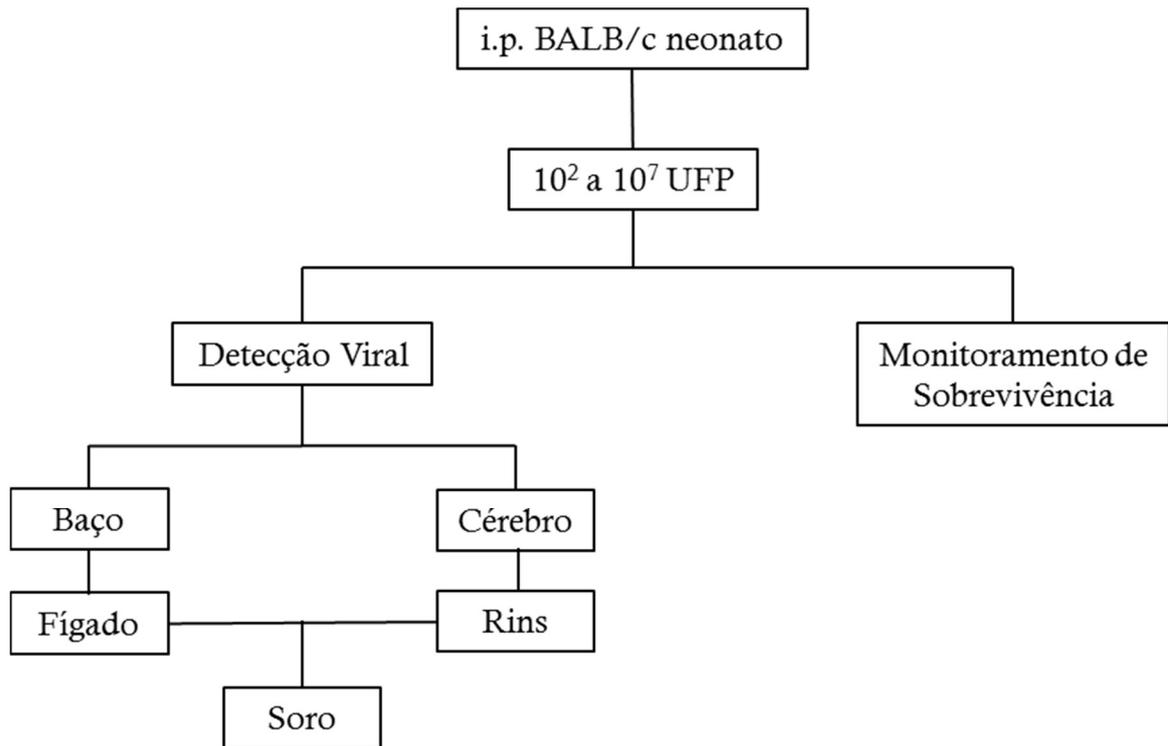


Figura 3 - Esquema representativo da estratégia experimental utilizada na análise da infecção de camundongos neonatos da linhagem BALB/c pela via i.p. com a cepa JHA1 de DENV-2. Foram feitas 5 tentativas independentes de infecção com quantidades administradas que variaram entre 10^2 a 10^7 UFP. Foram utilizados 8 animais para a análise de detecção viral nos tecidos (2 animais por dia de coleta) e 5 animais para análise de sobrevivência em cada ensaio.

3.3.4 Acompanhamento de peso, temperatura e morbidade dos camundongos adultos inoculados com a cepa JHA1

Em todos os experimentos os animais foram acompanhados quanto aos sinais de morbidade (variação de peso e temperatura) e sobrevivência, por um período de 21-30 dias. Para análise de variação de peso foi utilizada uma balança portátil de precisão (modelo BS 3000A, BIOPRECISA). Para avaliação de variação da temperatura foi utilizado um termômetro digital infravermelho (ColorCheck Auricular e Frontal AC322, Incoterm). A análise de morbidade foi realizada seguindo a classificação de PHARES (0: saudáveis; 1: coluna arqueada e pelos eriçados; 2: paralisia parcial dos membros posteriores e arqueamento da coluna; 3: paralisia completa dos membros posteriores e 4: moribundo ou morto)(PHARES et al., 2012).

3.3.5 Inoculação em camundongos adultos BALB/c com DENV JHA1 pela via i.v.

Para esse ensaio os camundongos adultos da linhagem BALB/c foram inoculados com 10^3 , 10^4 e 10^5 UFP do JHA1 em volume final de 50 μ L pela via i.v. (plexo retro-orbital). Os camundongos foram acompanhados diariamente quanto aos sinais de morbidade: variação de peso, temperatura e sobrevivência por até 21 dias. As coletas de sangue (realizadas pelo plexo submandibular) foram realizadas nos dias 3, 5 e 7 após inoculação, e as amostras foram depositadas em tubos contendo 10 μ L de citrato sódico a 7,2% (anticoagulante) para subsequente análises dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

3.3.6 Inoculação em camundongos adultos C57BL/6 pela i.c. com o isolado JHA1

Camundongos adultos machos da linhagem C57BL/6 adultos obtidos com 4 semanas de vida (n=10/grupo) foram anestesiados (mistura de quetamina e xilazina – 100 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente em 50 μ L finais pela via i.m.) para posterior manipulação (ERHARDT et al., 1984). Os animais foram inoculados com 10^2 UFP do JHA1 ou apenas meio no volume final de 40 μ L pela via i.c. Os animais foram acompanhados diariamente por até 21 dias, quanto aos sinais de morbidade (variação de peso e temperatura) e sobrevivência. As coletas de sangue (realizadas pelo plexo submandibular) foram realizadas nos dias 3, 5 e 7 após infecção e as amostras submetidas a análises dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os órgãos internos (baço, cérebro e fígado) foram coletados após eutanásia em câmara de CO₂, seguindo protocolo descrito no item 3.3.3

3.3.6.1 Extração de RNA total

A extração de RNA das amostras de sobrenadante dos órgãos analisados foi feita com kit de extração automática de RNA (MagMax TM-96 RNA Isolation Kit, Ambion, Austin, TX) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi eluído em 80 μ L de água livre de RNase e as amostras estocadas a -80 °C até serem processados.

3.3.6.2 Iniciadores utilizados no PCR em tempo real

Os iniciadores e sonda foram sintetizados pela Sigma Life Science com o marcador 5- FAM como coloração na sonda (Tabela 2). As sequências dos iniciadores e sonda foram degenerados de modo a permitir a amplificação da região alvo na UTR-5' do genoma do DENV de qualquer sorotipo de acordo com descrição prévia (LANCIOTTI, R. S. et al. 2008). Tanto os iniciadores quanto a sonda foram gentilmente cedidas pelo Prof. Paolo Zanotto (LEMB, Instituto de Ciências Biomédicas da USP).

Tabela 2. Oligonucleotídeos e sondas utilizados para amplificação dos genomas virais de DENV.

Nome da sequência	Sequência
DENV 1-4 FP ¹	AAggACTAgAggTTAK ² AggAgACCC
DENV 1-4 RP ³	CTgH ⁴ RgAgACAgCaggATCTCTg
DENV 1-4 5-FAM ⁵	AACAgCATATTgACgCTgggAR ⁶ AgACC-BHQ1 ⁷

¹Iniciador 5' anverso; ²nucleotídeo Gou T; ³Iniciador 3' reverso; ⁴ nucleotídeo não G; ⁵Timina marcada com fluoresceína na extremidade 5', excitação máxima em 495nm e emissão máxima em 520nm; ⁶ nucleotídeo Gou A; ⁷Black Hole Quencher 1 (480-580nm)

3.3.6.3 Quantificação em tempo real-PCR

A transcrição reversa e amplificação foram realizadas em uma placa de 96 poços (Axigen, Indianopolis, USA), utilizando 5 µL de RNA previamente extraído, no qual foi adicionado uma mistura contendo água, tampão master mix [2X] provenientes do Kit Ag-Path 1-step Ambion (Life, USA), juntamente com 10 pM de cada primer (10 µM) (forward e reverse) e a sonda (5 µM), com volume final da reação de 20 µl. A reação foi realizada no termociclador *Real Time 7300 System* (Applied, USA). A transcrição foi efetuada à 45 °C por 15 min. A amplificação foi feita a partir de uma etapa de desnaturação de 95 °C durante 10 min, seguida de 45 ciclos de 95 °C por 10 s e 55 °C por 1 min, fase na qual houve a coleta de dados de fluorescência. Como controle foi utilizado uma amostra padrão positiva para DENV-2 e diluição com concentrações previamente definidas. Como controle negativo foi utilizado água livre de DNA/RNase no lugar da amostra.

3.4 Atenuação do isolado JHA1, reversão da neurovirulência e análise das alterações genéticas por sequenciamento

3.4.1 Atenuação da cepa JHA por passagens sequenciais em células de inseto.

O JHA1 de DENV2 foi submetido ao processo de atenuação por passagens sequenciais em cultura de células de mosquito *A. albopictus* - C6/36, cultivadas em meio Leibovitz 15 (L-15, Embriolife) e suplementadas com 5% de SFB. As células foram mantidas à 28 °C até atingir 80% de confluência em garrafas de cultivo (25 cm²), em seguida, 200 µL de suspensão viral do JHA1 foram adicionados às células. A mistura foi incubada por 1 h em estufa a 28 °C para adsorção. Após o período de adsorção, foram adicionados 5 mL de meio L-15 com 5% de SFB retornando, posteriormente, à estufa a 28 °C até que os sincícios (efeito citopático) fossem observados. O processo foi repetido 29 vezes (p.29 cél.). Em seguida iniciou-se o processo de reversão da neurovirulência em animais utilizando o isolado p.29 cél., conforme descrito no item 3.4.2.

3.4.2 Inoculação em camundongos neonatos BALB/c pela via i.c, com vírus JHA1 após atenuação em células C6/36.

Camundongos neonatos da linhagem BALB/c foram utilizados para inoculação do sobrenadante da 29^a passagem de cultura de células do JHA1 pela via i.c. com 10² UFP/ animal em 20 µL. No 5^o dia após a inoculação os animais foram eutanasiados para coleta do tecido cerebral. O macerado cerebral foi preparado em meio L-15, centrifugado a 3.000 g por 5 min., e o material obtido foi denominado p.29 i.c. neo. Posteriormente, para confirmar a atenuação e a reversão da neurovirulência, camundongos BALB/c adultos foram inoculados com 10² UFP/animal em volume de 40 µL pela via i.c. sob anestesia (vide item 3.3.6), com as cepas JHA1 parental, JHA1 p.29 cél. ou JHA1 p.29 i.c. neo. Durante o período de 21 dias foram acompanhados os sinais de morbidade e sobrevivência nos animais inoculados.

3.4.3 Análise de sequenciamento genético das cepas atenuada e readaptada à virulência

O sequenciamento das amostras e as análises das alterações genéticas das cepas virais foram feitas integralmente pela Prof^a Dra. Camila Malta Romano e pelo seu aluno Felipe Scassi Salvador no Instituto de Medicina Tropical – USP.

3.4.3.1 Extração e quantificação por PCR em tempo real

O RNA do vírus JHA1 foi extraído por kit comercial QiAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) conforme recomendações do fabricante, para as reações de cDNA e PCR em tempo real. Para a reação de obtenção do cDNA foi utilizado o método de *two step* (onde o cDNA é sintetizado separadamente da reação de amplificação) por kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Para as reações de PCR em tempo real foi utilizada a plataforma 7300 Real-Time PCR System da Applied Biosystems e a metodologia de Taqman (que consiste na detecção de fluorescência por sondas). Na reação de PCR em tempo real, foi utilizada a Taq DNA polimerase do kit, assim com o Taq PCR Master Mix Kit, e dNTPs em concentrações recomendadas. Como molde foram utilizados os cDNAs obtidos após as passagens dos isolados virais.

Foram utilizados os iniciadores e sonda descritos Salvador, E. (Tabela 3) para a realização da reação de PCR em tempo real (SALVADOR, 2016). Em placa específica para a reação de PCR em tempo real (96 poços da Axygen), após a adição dos reagentes a placa foi selada e posicionada na plataforma do 7300 Real-Time PCR System da Applied Biosystems para início dos ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação da fita de DNA. O ciclo de temperaturas e tempos foram: 50 °C por 2 min., 95 °C por 10 min., 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min., sendo este ciclo repetido por 45 vezes.

Tabela 3. Oligonucleotídeos e sondas utilizados para amplificação dos genomas virais de DENV.

Nome da sequência	Sequência
DENV-2 FP ¹	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCC
DENV-2 RP ³	GAGACAGCAGGATCTCTGGTC
DENV-2 6-FAM ⁵	AGCATATTGACGCTGGGA-MGB ⁶ -BHQ1 ⁷

¹Iniciador 5' anverso; ²nucleotídeo G ou T; ³Iniciador 3' reverso; ⁴nucleotídeo não G; ⁵Carboxifluoresceína, excitação máxima em 495nm e emissão máxima em 520nm; ⁶Quencher eclipse; ⁷Black Hole Quencher 1 (494-515nm)

3.4.3.2 Sequenciamento

As análises de sequenciamento foram realizadas no laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, em colaboração com o Felipe Scassi Salvador e a Dra. Camila Malta Romano

4 RESULTADOS

O objetivo principal desse trabalho foi a busca de modelos experimentais alternativos que empreguem camundongos imunocompetentes para infecção com um isolado clínico de DENV2 previamente descrito como naturalmente neurovirulento (JHA1) para camundongos BALB/c após a administração pela via i.c. Os resultados obtidos ao longo do presente estudo foram divididos em três grandes blocos para uma melhor organização e compreensão do conteúdo. Nos dois primeiros blocos descrevemos os resultados obtidos a partir da inoculação do JHA1 em linhagens de camundongos imunocompetentes (neonatos e adultos) por diferentes vias de administração. O primeiro bloco foi dedicado à inoculação do JHA1 em camundongos (adulto ou neonatos) BALB/c pelas vias i.p. e i.v. No segundo bloco descrevemos os resultados obtidos após a inoculação do JHA1 em camundongos C57BL/6 utilizando as vias i.c. e i.v. Finalmente, avaliamos o surgimento e a fixação de possíveis mutações associadas à neurovirulência do isolado clínico JHA1 como forma de buscar uma explicação para as propriedades únicas deste isolado de DENV.

4.1 BLOCO 1: Inoculação do isolado clínico JHA1 em camundongos neonatos da linhagem BALB/c

4.1.1 *Inoculação em camundongos BALB/c neonatos pela via i.p.*

Com o objetivo de avaliar o potencial de infecção sistêmica em camundongos imunocompetentes pelo JHA1, cinco experimentos independentes foram realizados com camundongos BALB/c neonatos utilizando a via de inoculação i.p. Ensaios foram realizados para detecção de partículas virais viáveis no soro (viremia) e órgãos como baço, cérebro, fígado e rins em animais administrados com doses de 10^2 , 10^4 ou 10^5 UFP do JHA1. Como é possível observar na Figura 4A, não houve detecção do vírus por esse método. Duas outras estratégias experimentais independentes foram realizadas em que, após a administração de 10^4 ou 10^7 UFP, acompanhou-se diariamente os animais quanto ao surgimento de sinais de

morbidade e mortalidade. Nas condições testadas, não houve sinais de infecção demonstrável por letalidade (Figura 4). Em suma, frente aos resultados obtidos, não foi possível demonstrar a infecção de camundongos BALB/c neonatos por essa via. Assim sendo, o próximo passo no desenvolvimento de um modelo de infecção com o JHA1 se baseou no uso da via i.v. em camundongos BALB/c adultos.

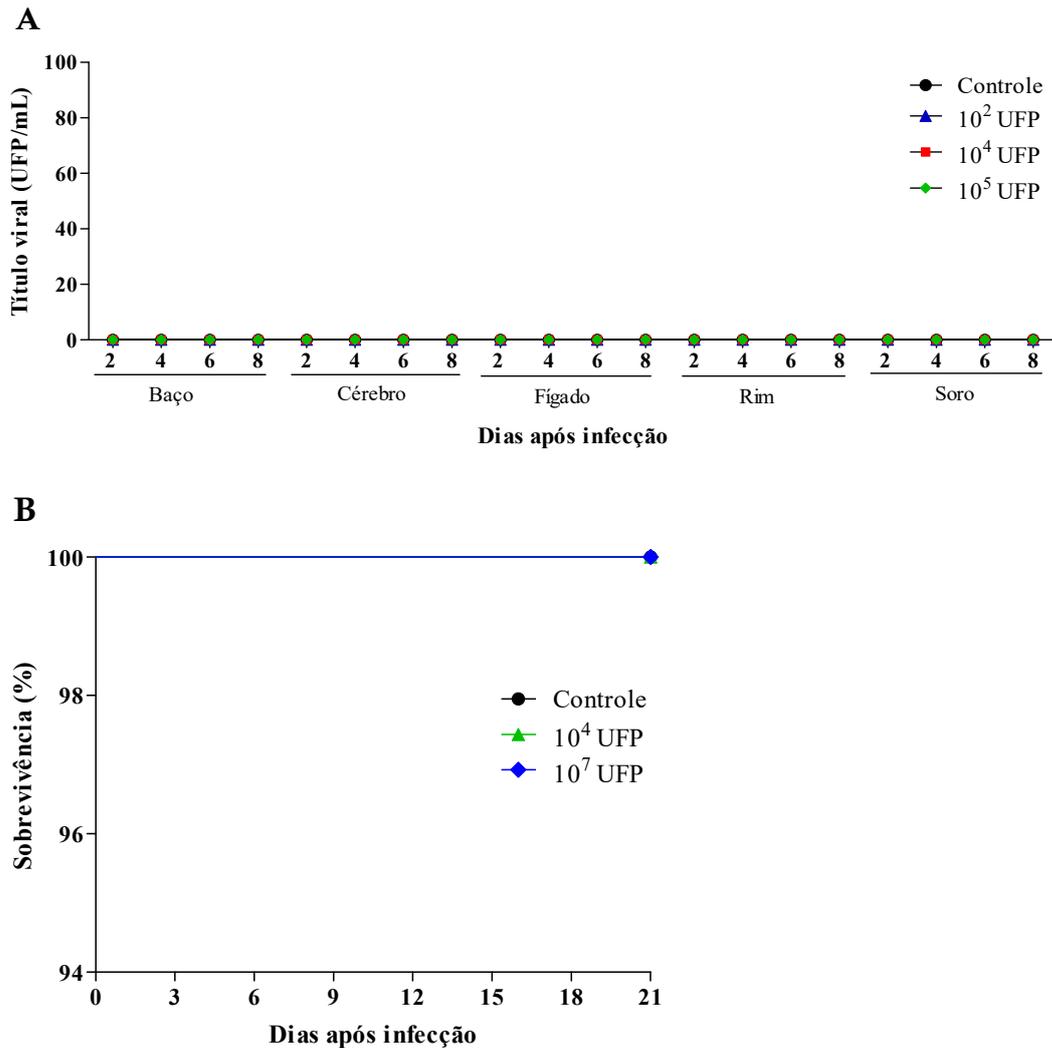


Figura 4 - Inoculação em camundongos neonatos da linhagem BALB/c pela via i.p. com o JHA1. Camundongos BALB/c neonatos (2 dias de vida) foram submetidos à inoculação de 10² a 10⁷ UFP do JHA1 pela via i.p. (A) Titulação em células Vero dos vírus presentes no soro e nos órgãos (baço, cérebro, fígado e rim) dos animais inoculados com diferentes quantidades do JHA1. Os valores de título viral foram determinados a partir de 3 experimentos independentes com 8 animais por grupo experimental. (B) Acompanhamento da sobrevivência dos animais inoculados com 10⁴ ou 10⁷UFP do JHA1 durante o período de 21 dias. Os valores de sobrevivência foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes com 5 animais por grupo experimental.

4.1.2 Inoculação do JHA1 em camundongos BALB/c adultos pela via i.v.

Os resultados anteriores demonstram que a via i.p. não se mostrou adequada para a infecção de camundongos BALB/c neonatos com o JHA1. Desta forma, submetemos camundongos BALB/c adultos (4 semanas) à administração de 3 diferentes doses (10^3 , 10^4 ou 10^5 UFP) do JHA1 pela via i.v. O acompanhamento de morbidade (variação de peso e temperatura) e mortalidade foi realizado diariamente pelo período de 21 dias. A avaliação de parâmetros hematológicos e a dosagem de enzimas marcadoras de danos teciduais foram feitas no 3º, 5º e 7º dias após a inoculação e no 5º dia após inoculação, respectivamente. Não foram observados sinais clássicos.

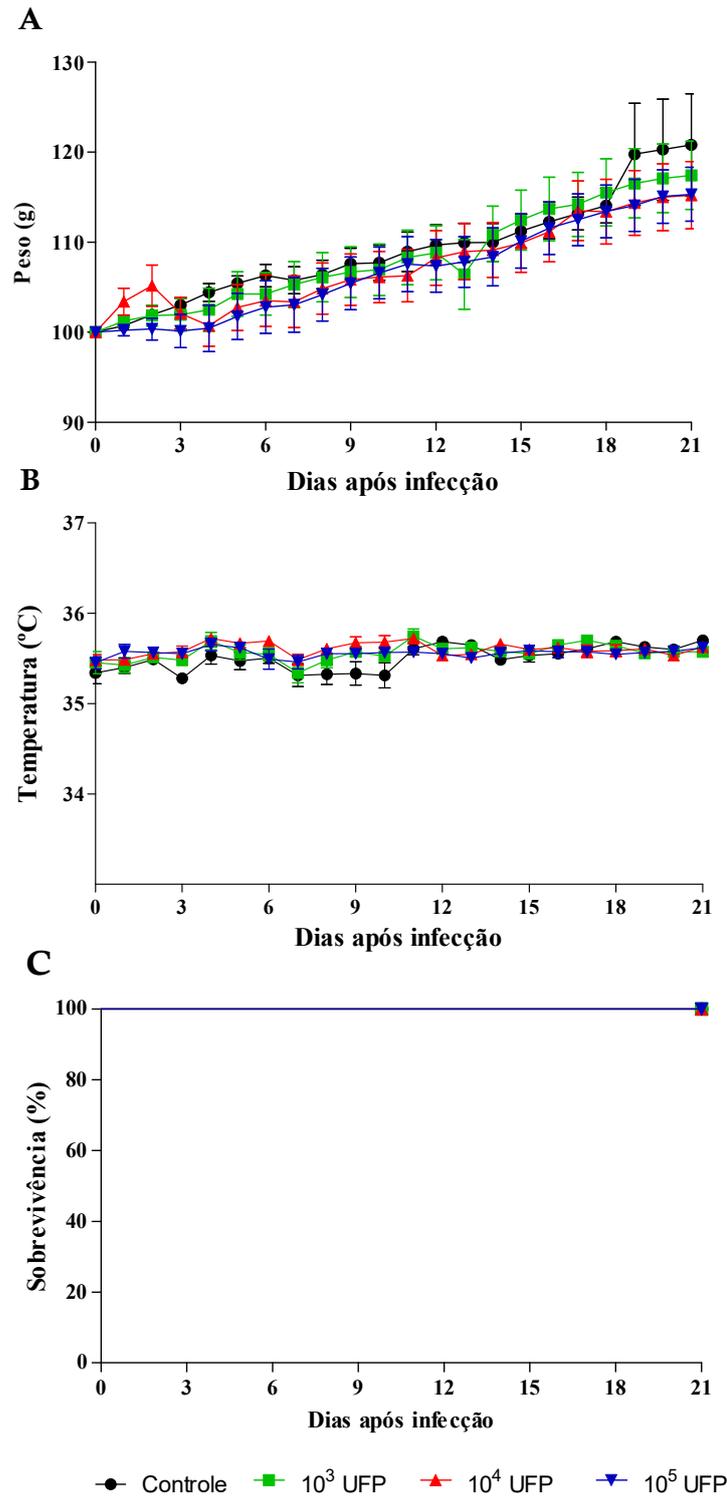


Figura 5 - Análise de sobrevivência, variação de peso e temperatura corporal em camundongos adultos BALB/c inoculados pela via i.v com JHA1. Camundongos BALB/c (4 semanas) foram submetidos à inoculação de 10^3 , 10^4 ou 10^5 UFP do JHA1 pela via i.v. e acompanhados quanto à sobrevivência e sinais de morbidade (perda de peso e variação de temperatura). (A) Determinação do peso e (B) Variação de temperatura em animais inoculados. (C) Acompanhamento da sobrevivência dos animais inoculados durante período de 21 dias. Os valores foram determinados a partir de 3 experimentos independentes com 10 animais por grupo experimental.

de morbidade, como variação de peso corporal, temperatura, e mortalidade (Figura 5). No entanto, quando comparados os parâmetros hematológicos, observamos que os animais inoculados com a maior dose de vírus (10^5 UFP) apresentaram redução do número de plaquetas no 3º dia após o inóculo, quando comparados ao grupo controle (Figura 6). Foi observado também o aumento dos níveis séricos de LDH no 5º dia após a inoculação nos grupos que receberam as maiores doses de vírus (10^4 e 10^5 UFP) em relação ao grupo controle (Figura 7).

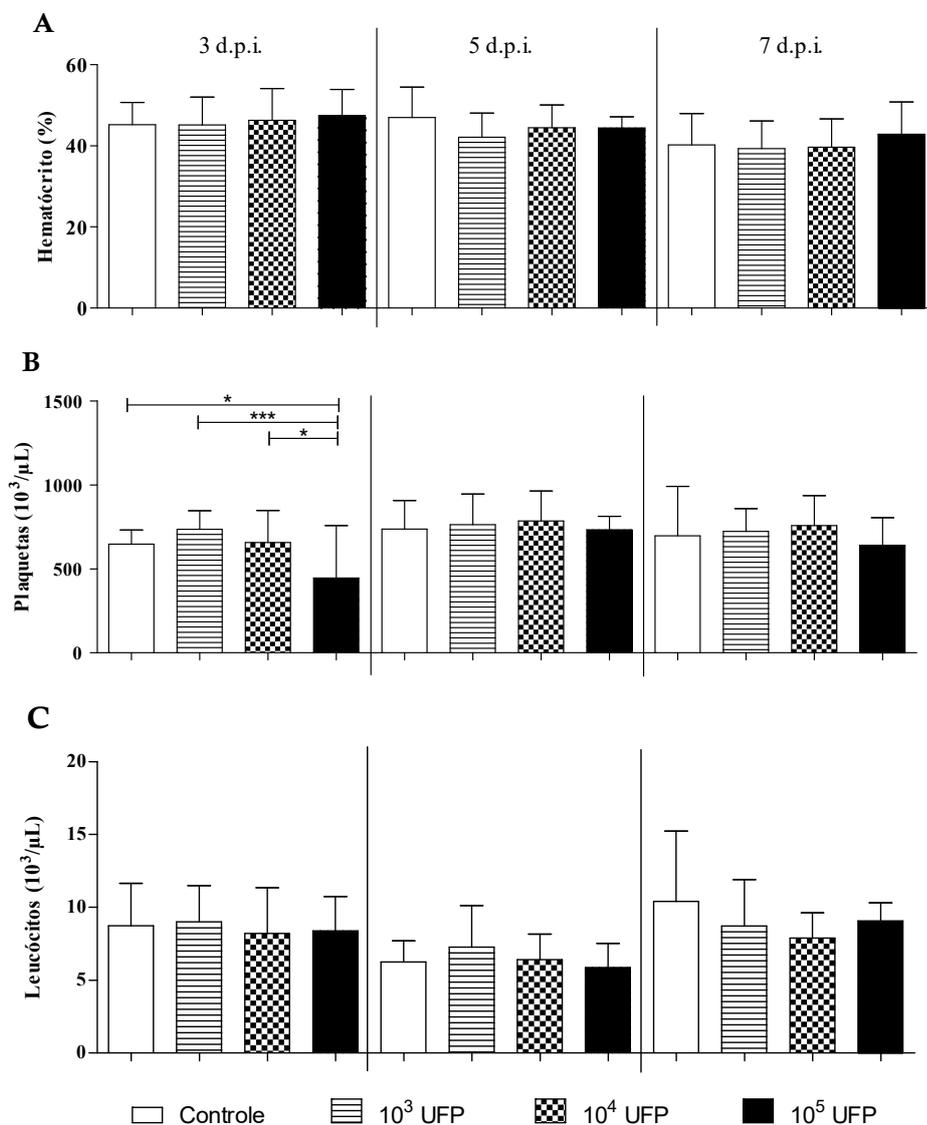


Figura 6 - Análise de parâmetros hematológicos em camundongos BALB/c inoculados pela via i.v. com JHA1. Amostras de sangue dos animais foram coletadas em diferentes períodos (3º, 5º e 7º dia após infecção) e submetidas à análise de parâmetros hematológicos. (A) Determinação dos valores de hematócrito; (B) Determinação dos valores de plaquetas e (C) Determinação dos valores de leucócitos. Os valores foram determinados a partir de 3 experimentos independentes com 10 animais por grupo experimental. As diferenças entre os grupos inoculados para os parâmetros avaliados foram determinados por análise de variância e

posterior teste de comparação múltipla de *Bonferroni*, onde * e *** indicam $p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente em comparação ao grupo de animais controle.

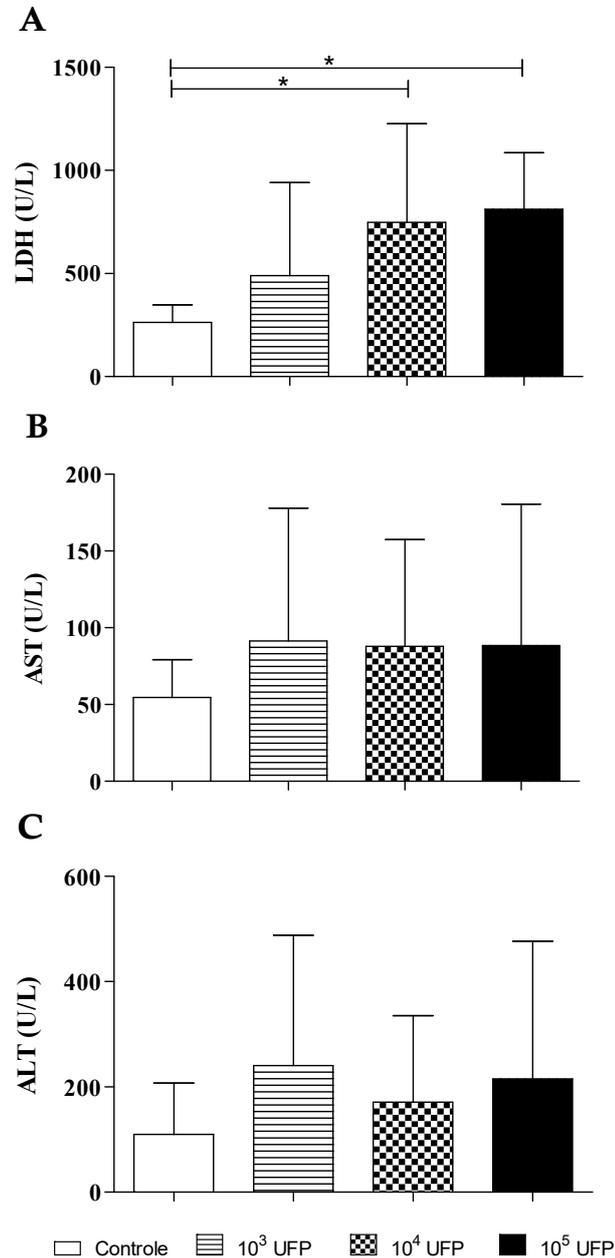


Figura 7 - Análise das alterações metabólicas desencadeadas em camundongos adultos BALB/c inoculados pela via i.v. com o JHA1. Análise de danos teciduais baseada nos índices das enzimas LDH, AST e ALT desencadeados após inoculação do JHA1 (10^3 , 10^4 ou 10^5 UFP). Amostras de soro foram coletadas no 5º dia após a inoculação. (A) Determinação dos índices de LDH, (B) AST e (C) ALT, nos animais inoculados com as diferentes doses do JHA1. Os valores foram determinados a partir de 3 experimentos independentes com 10 animais por grupo experimental. As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância e posterior teste de comparação múltipla de *Bonferroni* onde * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo de animais controle.

4.2 BLOCO 2: Infecção de camundongos adultos C57BL/6 com o isolado clínico JHA1

4.2.1 Infecção de camundongos C57BL/6 com DENv2 JHA1 pela via i.c.

Avaliamos também a capacidade de infecção do JHA1 quando inoculado pela via i.c. em camundongos adultos da linhagem C57BL/6, uma vez que essa linhagem apresenta perfil de resposta imunológica distinta da linhagem BALB/c (perfil Th1). Os camundongos foram submetidos à inoculação i.c. com uma dose de 10^2 UFP e acompanhados diariamente pelo período de 21 dias quanto ao surgimento de sinais de morbidade (variação de peso e temperatura) ou mortalidade.

De forma semelhante ao observado por Amorim et al. 2012, com camundongos BALB/c, após administração do vírus pela via i.c. os animais da linhagem C57BL/6 apresentaram perda de peso e variação da temperatura corporal entre os dias 7 e 10 após a inoculação (Figura 8A e B) e mortalidade de 100% (Figura 8C). Também

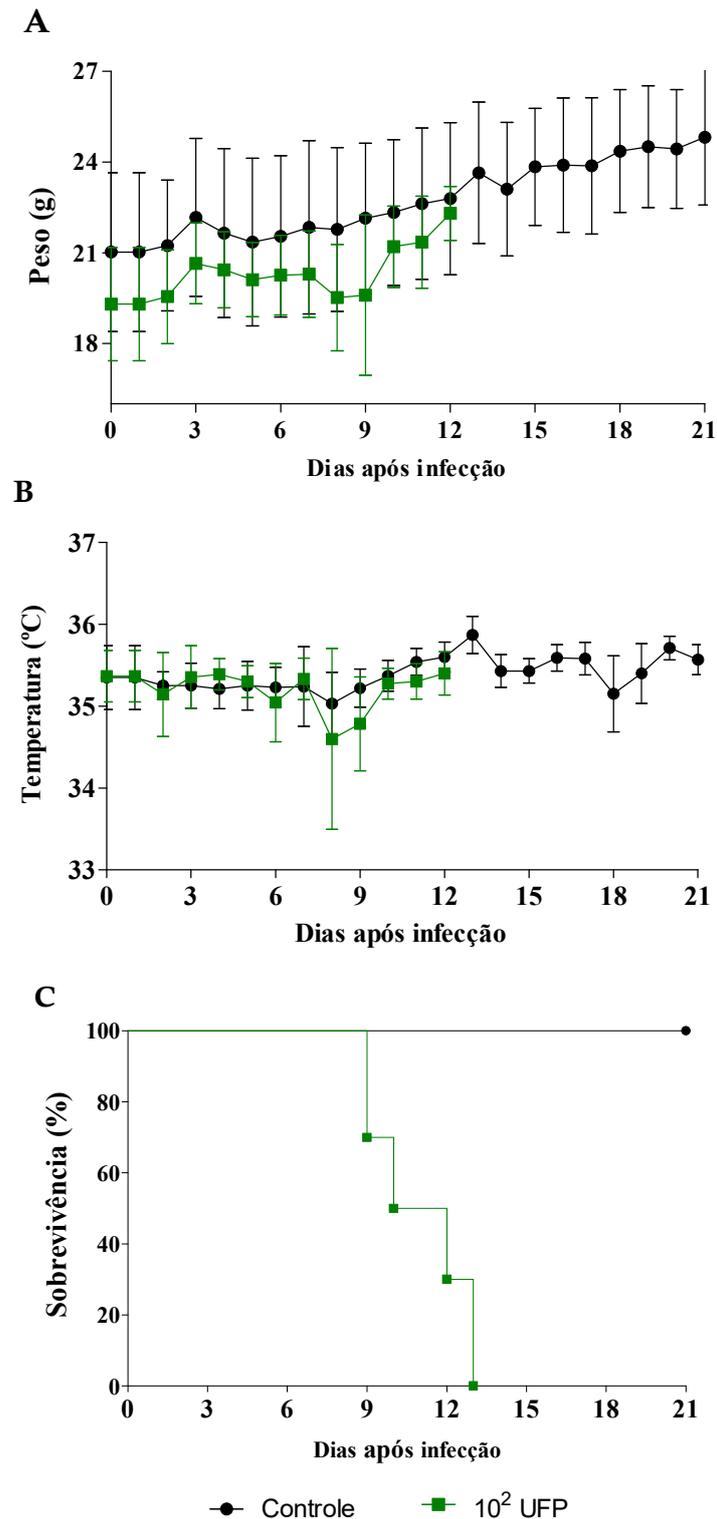


Figura 8 - Avaliação de sobrevivência e sinais de morbidade em camundongos C57BL/6 após a inoculação do JHA1. Camundongos C57BL/6 (4 semanas) foram submetidos à inoculação de 10² UFP do JHA1 pela via i.c. e acompanhados quanto à sobrevivência e presença de sinais de morbidade (perda de peso e variação de temperatura) durante o período de 21 dias. (A) Determinação da variação de peso; (B) Variação de temperatura dos animais inoculados; (C) Acompanhamento da sobrevivência dos animais inoculados. Os valores foram determinados a partir de 4 experimentos independentes com 10 animais por grupo experimental. As diferenças entre os grupos para os parâmetros avaliados foram determinadas por análise de variância e posterior comparação por Teste t, onde * e *** indicam $p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente, em relação ao grupo de animais controle.

foi possível observar redução no percentual de hematócrito bem como a quantidade de leucócitos no 5º para o 8º dia após administração do isolado viral (Figura 9). No entanto, ao contrário do observado em BALB/c (AMORIM et al., 2012), não houve variações

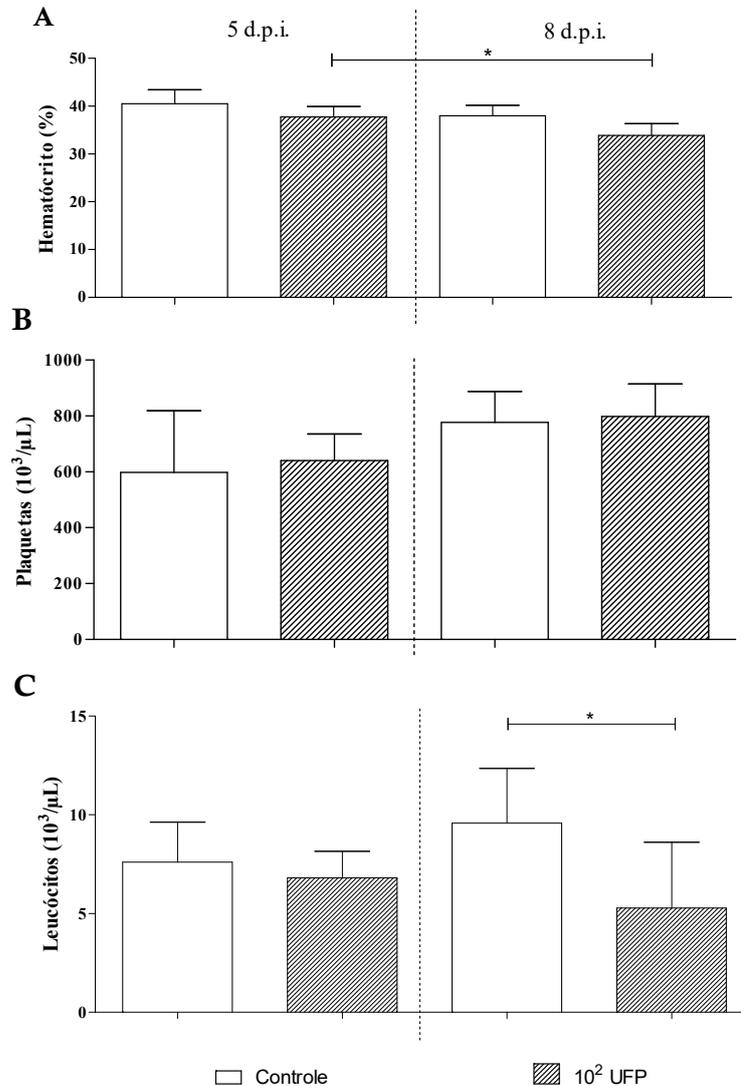


Figura 9 - Análise de alterações hematológicas observadas em camundongos adultos C57BL/6 inoculados pela via i.c. com JHA1. Amostras de sangue dos animais foram coletadas no 5º e 8º dias após infecção e submetidas à análise dos parâmetros hematológicos. (A) Determinação dos valores de hematócrito, (B) Determinação dos valores de plaquetas e (C) Determinação dos valores de leucócitos. Os valores foram determinados a partir de 4 experimentos independentes com 10 animais por grupo experimental. As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância e posterior teste de comparação múltipla de Bonferroni onde * indica $p < 0,05$ em comparação ao grupo de animais controle.

nos níveis das enzimas marcadores de danos teciduais (Figura 10) e os animais inoculados não apresentaram sinais de morbidade tal como: paralisia dos membros posteriores e arqueamento da coluna, provavelmente devido à evolução rápida da

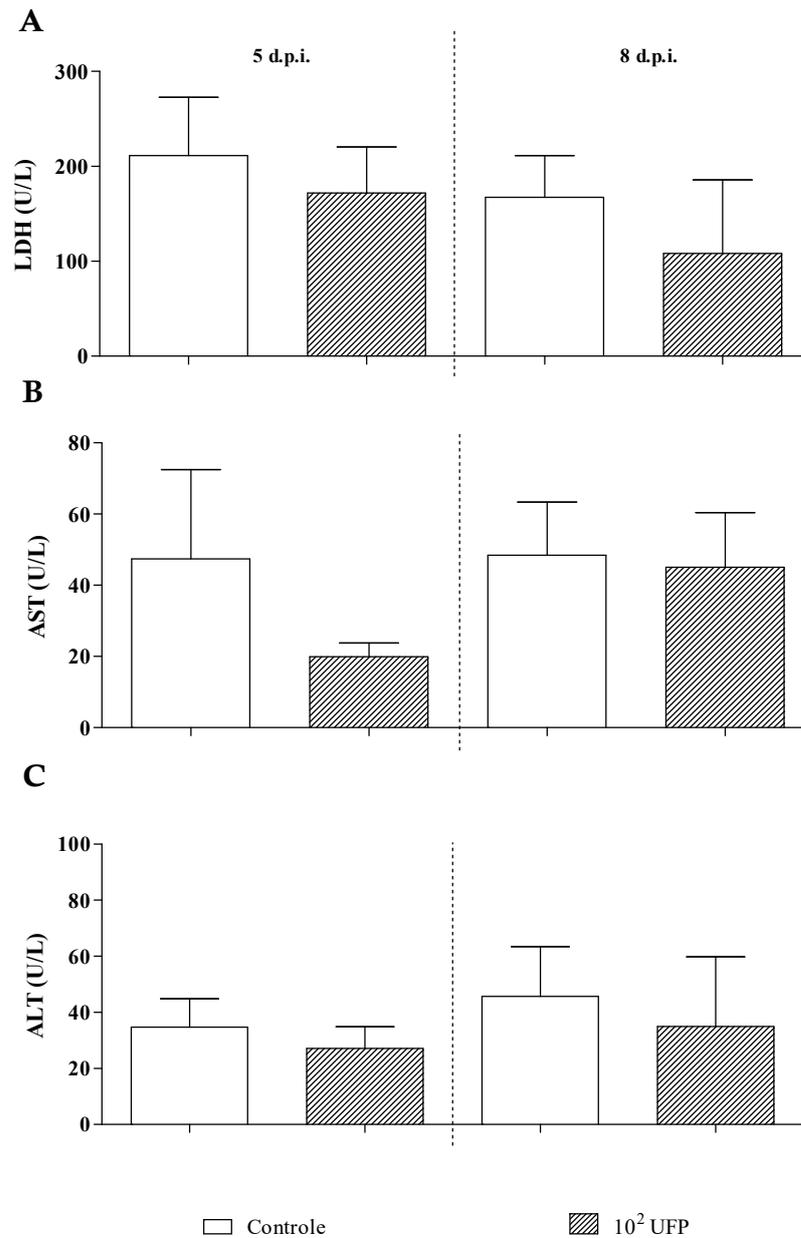


Figura 10 - Análise indireta da ocorrência de lesões teciduais em camundongos adultos C57BL/6 inoculados pela via i.c com o JHA1. Análise dos danos teciduais por medição das enzimas LDH, AST e ALT após a inoculação do JHA1 (10² UFP). Amostras de soro foram coletadas no 5º dia após a inoculação. (A) Determinação dos índices de LDH; (B) AST e (C) ALT nos animais inoculados com o JHA1. Os valores foram determinados a partir de 4 experimentos independentes com 10 animais por grupo experimental. As diferenças entre os grupos inoculados para os parâmetros avaliados foram determinadas por análise de Teste t, onde ** indica $p < 0,01$ em comparação ao grupo de animais controle.

infecção e morte. Analisamos ainda a presença do RNA viral no sobrenadante dos órgãos (baço, cérebro e fígado) do grupo administrado com o 10² UFP do JHA1 e observa-se na Figura 11 que o RNA viral foi detectado apenas no tecido cerebral dos animais inoculados.

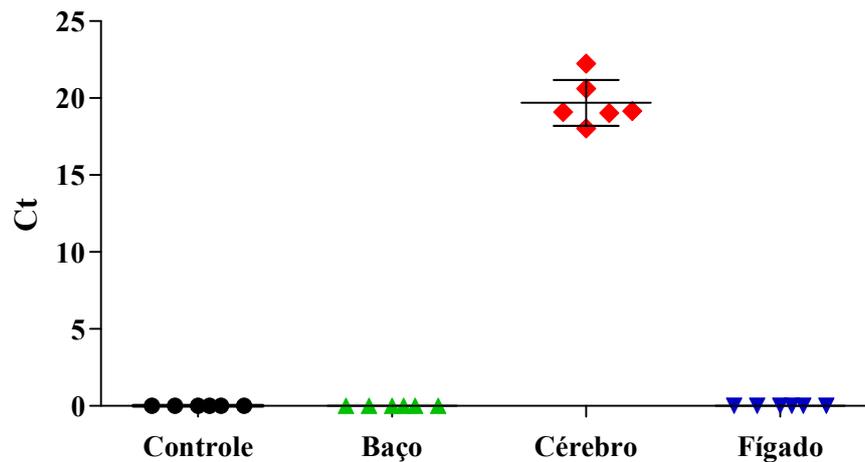


Figura 11 - Detecção do genoma viral por PCR em tempo real nos órgãos de C57BL/6 adultos inoculados com o JHA1. Camundongos C57BL/6 adultos foram submetidos à inoculação com 10^2 UFP do JHA1 pela via i.c. e acompanhados quanto aos sinais de morbidade avançado (estágio moribundo). Os animais foram eutanasiados e os órgãos (baço, cérebro e fígado) coletados. Os testes de detecção viral foram realizados a partir da extração de RNA das amostras de sobrenadante dos órgãos dos animais inoculados e os valores foram obtidos após reação. Os valores foram determinados a partir de 1 experimento com 5 animais por grupo experimental.

4.3 BLOCO 3: Análise de mutações genéticas antes e após atenuação e reversão da neurovirulência do isolado clínico JHA1 de DENV2

Devido à neurovirulência do JHA1 a animais imunocompetentes, como observado após inoculação pela via i.c., buscamos encontrar possíveis bases genéticas para tal propriedade, muito peculiar entre isolados de DENV. Para isso foram feitas 29 passagens sequenciais do JHA1 em células de inseto (C6/36) e, obtivemos o isolado de JHA1, intitulado p.29 cél., para avaliação das possíveis alterações genéticas envolvidas com a atenuação em camundongos. A virulência do isolado p.29 foi avaliada após inoculação em cérebro de camundongos BALB/c neonatos (dois dias de vida). Como indicado na Figura 12, os vírus que foram recuperados a partir de macerado cerebral dos camundongos inoculados geraram a amostra (p.29 i.c. neo). A partir dessa amostra, foi feito o teste de infecção em camundongos adultos pela via i.c.

Para avaliar a virulência dos isolados, camundongos BALB/c adultos foram inoculados com 10^2 UFP dos diferentes derivados do JHA1 e monitorados por 21 dias quanto à sobrevivência. Como observado na Figura 13, as passagens do JHA1 em células de inseto levaram à atenuação do isolado como mostrado após inoculação pela via i.c. em camundongos BALB/c. No entanto, os resultados

apresentados na Figura 14, deixam claro que o derivado atenuado recupera sua neurovirulência para animais adultos após uma única passagem em cérebro de camundongos neonatos.

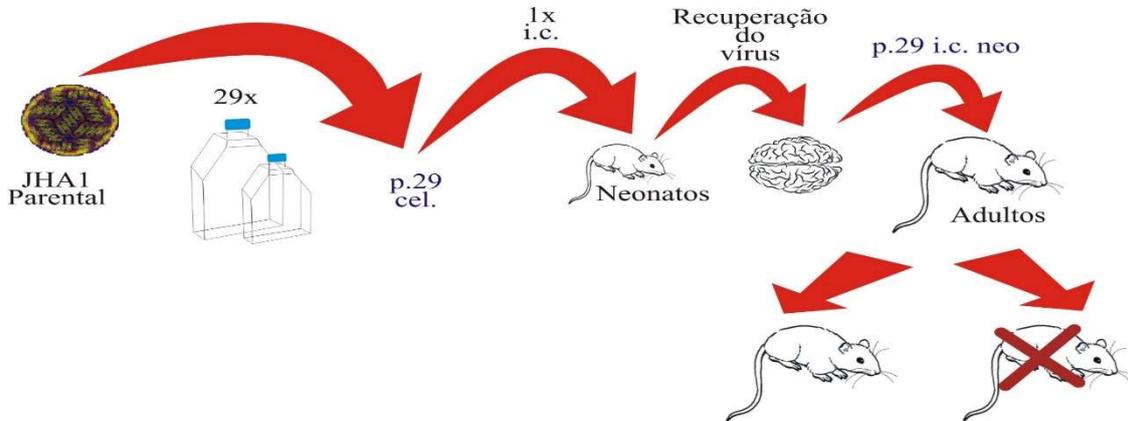


Figura 12 - Esquema da estratégia experimental utilizada para a identificação de possíveis mutações associadas a neurovirulência do JHA1. O parental foi submetido a 29 passagens sequenciais em células de inseto (C6/36) e o vírus recuperado foi denominado p.29 cél. Posteriormente o isolado p.29 foi inoculado em cérebro de camundongos BALB/c neonatos (2 dias de vida) pela via i.c. (10^2 UFP/animal). Os animais foram eutanasiados no 5º dia após a inoculação d vírus e os cérebros foram coletados e processados, o que resultou na obtenção do novo isolado denominado p.29 i.c. neo. Posteriormente, alíquotas dos isolados virais contendo 10^2 UFandraP foram inoculados em camundongos BALB/c adultos (4 semanas) pela via i.c. Os camundongos foram acompanhados quanto à sobrevivência pelo período de 21 dias.

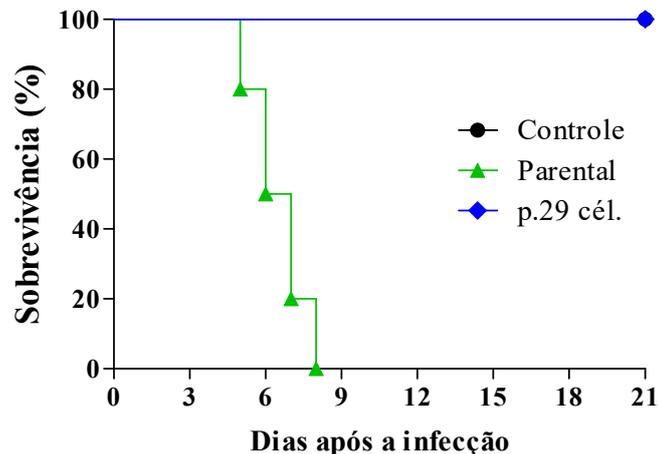


Figura 13 - Análise de sobrevivência de camundongos BALB/c adultos que receberam a cepa parental e a cepa atenuada p.29 cél. Camundongos BALB/c (4 semanas) adultos foram inoculados com 10^2 UFP de cada isolado viral e acompanhados quanto à sobrevivência pelo período de 21 dias. Os valores foram determinados a partir de 1 experimento com 10 animais por grupo experimental.

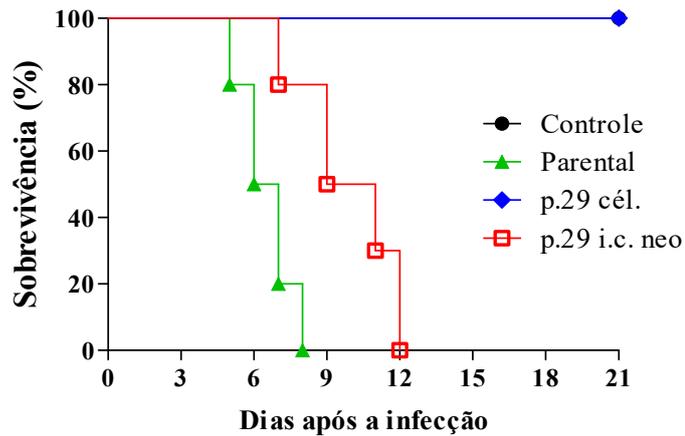


Figura 14 - Análise de sobrevivência de camundongos BALB/c adultos inoculados pela via i.c. com derivados do JHA1. Camundongos BALB/c (4 semanas) foram submetidos a inoculação com 10^2 UFP de cada um dos isolados testados (JHA1, p.29 cél. e p.29 i.c. neo) pela via i.c. e acompanhados pelo período de 21 dias. Os valores foram determinados a partir de um experimento com 10 animais por grupo experimental.

No sentido de buscar uma explicação para a perda da virulência do JHA1 após passagens em cultura celular, assim como para a recuperação da neurovirulência após uma única passagem em cérebro de camundongos neonatos, foram feitos sequenciamentos dos genomas virais a partir das amostras recolhidas em parceria com a equipe de pesquisa liderada pela Dra. Camila Romano no Instituto de Medicina Tropical em São Paulo. Como indicado na Figura 15, nenhuma das mutações detectadas em genes que codificam para proteínas estruturais e não estruturais mostra uma correlação clara com a atenuação e a posterior recuperação da neurovirulência, do JHA1.

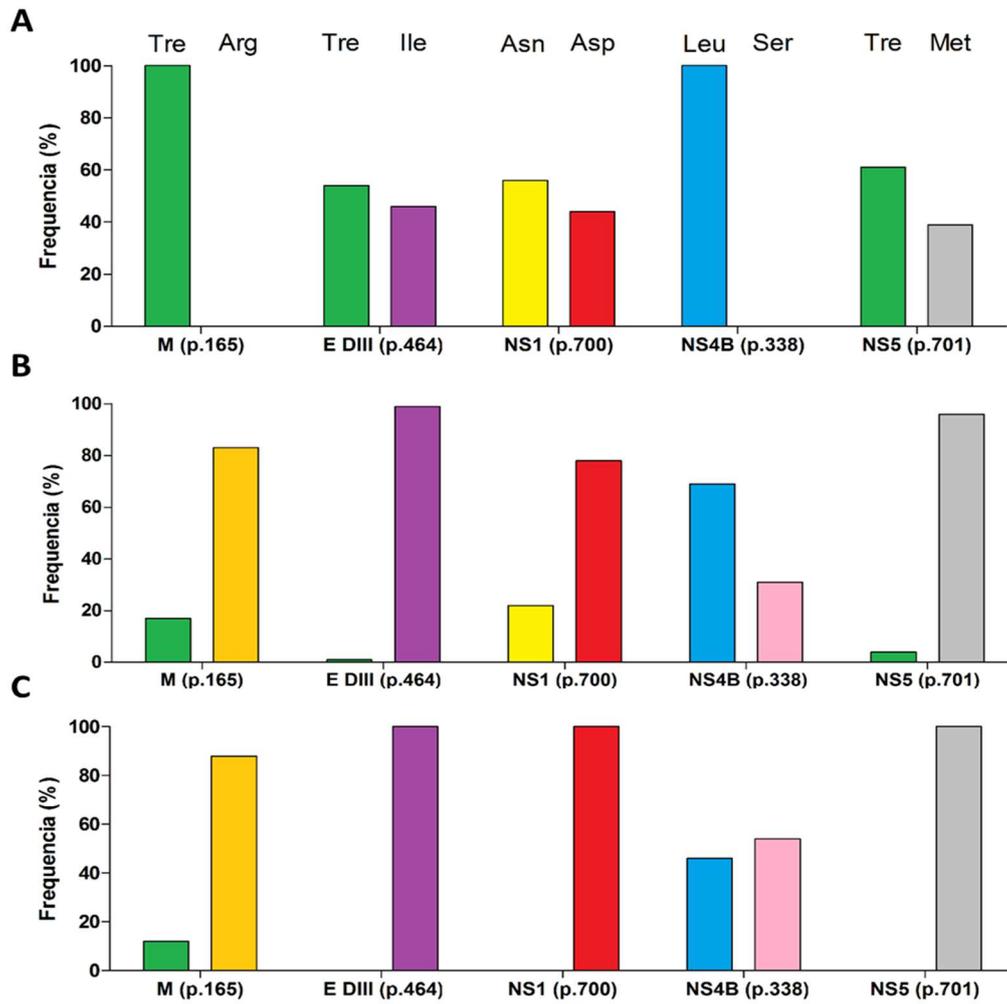


Figura 15 - Detecção de mutações específicas em diferentes proteínas dos derivados do JHA1 após 29 passagens em cultura de células e uma passagem em cérebro de camundongos neonatos. (A) JHA1 parental; (B) JHA1 p.29 cél. (C) JHA1 p.29 i.c. neo. Admite-se Tre (treonina), Arg (arginina), Ile (isoleucina), Asn (asparagina), Asp (ácido aspártico), Leu (leucina), Ser (serina) e Met (metionina).

5 DISCUSSÃO

Um dos fatores que dificultam o desenvolvimento de vacinas contra a dengue é a falta de um modelo animal capaz de mimetizar os sinais de doença vista em humanos. Em trabalho anterior (AMORIM et al., 2012), foi escrito um isolado clínico de DENV que se mostrou naturalmente neurovirulento em camundongos imunocompetentes quando inoculado pela via i.c. Com a intenção de explorar o uso deste isolado viral para o desenvolvimento de novos modelos experimentais, o presente trabalho buscou avaliar diferentes vias de inoculação para o isolado clínico JHA1. Os resultados obtidos demonstraram que o JHA1 foi capaz de infectar camundongos (BALB/c) imunocompetentes adultos sem a necessidade de adaptação ao hospedeiro murino somente após inoculação pela via i.c.. Nas tentativas de infecção de camundongos neonatos pela via i.p. observamos ausência de mortalidade, sinais de morbidade e presença de partículas virais em órgãos e sangue dos animais inoculados. Alternativamente, utilizamos a via i.v. para a infecção de camundongos adultos, o que levou a sinais de infecção, mas sem semelhanças com as alterações vistas em humanos (LEONG et al., 2007; ZELLWEGER; SHRESTA, 2014).

O trabalho também envolveu o uso do isolado JHA1 em outra linhagem de camundongos imunocompetentes (C57BL/6). Animais adultos inoculados pela via i.c. apresentaram resultados semelhantes aos obtidos com animais da linhagem BALB/c. Esse resultado abre perspectivas para o uso da linhagem C57BL/6 em modelos de infecção por DENV2, fato promissor pois essa linhagem dispõe de diversos derivados isogênicos deficientes na expressão de genes possivelmente envolvidos na replicação do vírus ou em genes relacionados à montagem de respostas imunológicas, inatas ou adquiridas, decorrentes da infecção viral.

Em uma primeira abordagem experimental para avaliarmos o uso de vias alternativas de administração do isolado JHA1 em BALB/c, utilizamos camundongos neonatos administrados pela via i.p. Resultados publicados anteriormente com outros isolados ou linhagens adaptadas detectaram alterações hematológicas, aumento dos níveis de enzimas hepáticas sinais de infecção e/ou presença de partículas virais em circulação e em tecidos em camundongos

inoculados pela via i.p. e morte (BARROS et al., 2015; COSTA et al., 2011; PAES et al., 2005; RAJMANE et al., 2013; TAN et al., 2010; YAMANAKA; KONISHI, 2009). No entanto, as condições experimentais se mostraram distintas em função de diferentes variáveis, isto é, isolado ou cepa utilizada, linhagens de animais imunodeficientes, quantidades de vírus inoculada ou, até mesmo, a incorporação de adjuvantes (BARROS et al., 2015; GUABIRABA, 2013; PAES et al., 2005; RAJMANE et al., 2013; TAN et al., 2010; WILLIAMS et al., 2009; YAMANAKA; KONISHI, 2009). Em relação aos nossos resultados, observamos que mesmo após a administração em camundongos neonatos com diferentes quantidades de vírus pela via i.p. (10^2 a 10^7 UFP) não foi possível detectar partículas virais nos órgãos (baço, cérebro, fígado e rins) e no sangue dos animais inoculados, e não foi possível observar qualquer sinal de morbidade. É importante salientar que a escolha pelo uso de camundongos neonatos (2 dias de vida) se baseou no fato de que esses animais apresentam um sistema imunológico em desenvolvimento e, portanto, seriam mais susceptíveis à infecção (HUANG et al., 2000). Esses resultados indicaram que, mesmo possuindo alta virulência para camundongos imunocompetentes, o isolado JHA1 não se mostrou capaz de se replicar e infectar nos animais após administração pela via i.p.. Esse resultado vai de acordo a relatos anteriores que mostram a resistência de camundongos imunocompetentes à infecção pelo DENV quando administrados por vias parenterais (BARROS et al., 2015; GUABIRABA, 2013; JOHNSON; ROEHRIG, 1999; PLUMMER; SHRESTA, 2014; WILLIAMS et al., 2009). No entanto, esse resultado conflita com a descrição inicial do isolado JHA1 quando testado pela via i.c. em animais adultos imunocompetentes (AMORIM et al., 2012).

Uma segunda abordagem experimental feita no sentido de desenvolvermos um modelo experimental alternativo para infecção para DENV baseou-se no uso de camundongos adultos inoculados com o isolado JHA1 pela via i.v.. Nesses ensaios trabalhamos com quantidades de vírus semelhantes àquelas inoculadas pelo vetor (em torno de 10^4 a 10^6 UFP/ por picada) durante o processo de infecção em humanos (BARROS et al., 2015). Os resultados obtidos indicaram aumento nos níveis de LDH em camundongos inoculados pela via i.v. com o JHA1 e redução plaquetária transiente (principal marcador de dengue com sinais de alarme em

humanos) (AMORIM et al., 2012; JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013; NOISAKRAN; PERNG, 2008). No entanto, não foram observados sinais de morbidade como arqueamento de coluna, paralisia de membros e letargia, como geralmente é visto em camundongos infectados com linhagens de DENV adaptadas para o hospedeiro murino (FERREIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2016; TAN et al., 2010). Esses resultados sugerem que camundongos imunocompetentes suportam replicação transiente do vírus, porém, não há geração de sintomas, sinais clínicos semelhantes aos observados na doença em seres humanos e morte associada ao desafio com o vírus, corroborando com dados de outros grupos de pesquisa (LAUREN; YAUCH; SHRESTA, 2008; PLUMMER; SHRESTA, 2014).

Diante das dificuldades encontradas para adaptarmos o uso do isolado JHA1 em modelos experimentais baseados em camundongos imunocompetentes após administração pelas vias i.p. e i.v., voltamos ao modelo de desafio pela via i.c., mas, desta vez, empregando animais da linhagem C57BL/6. Essa escolha foi respaldada pelo fato de que, ao contrário da linhagem BALB/c, a linhagem C57BL/6 dispõe de inúmeros derivados isogênicos nocauteados para genes específicos (ABDELHAY, 2002; BUSCHMAN; SKAMENE, 1999) que poderiam ser úteis em estudos posteriores sobre a relação patógeno/hospedeiro. Conseqüentemente, tal modelo abriria portas para futuros estudos sobre aspectos relacionados ao papel de receptores específicos ou de diferentes elementos do sistema imune, inato ou adaptativo, na resistência à infecção pelo DENV2. Os resultados obtidos foram promissores e demonstraram que a linhagem C57BL/6 é sensível ao JHA1 administrado pela via i.c. Após administração de baixa dose viral (10^2 UFP) os animais apresentaram variação de peso, variação de temperatura, redução no número de leucócitos e letalidade de 100% dos animais infectados. No entanto, assim como descrito por Oliveira e colegas (2016), em animais inoculados com uma cepa de DENV adaptada (NGC), não foi observado paralisia de membros inferiores ou arqueadura de coluna nos animais infectados, sinais conhecidos de encefalite (FERREIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2016). Também não foram observadas alterações nos índices de LDH, ALT e AST. Esses dados indicam que o modelo baseado em camundongos C57BL/6 é promissor, mas ainda carece que análises adicionais.

Outro ponto que mereceu nossa atenção foi a possível base genética para explicar a elevada neurovirulência do isolado JHA1. Neste sentido partimos para experimentos em que se buscou possíveis marcadores genéticos (mutações) que estariam diretamente relacionados à capacidade do JHA1 em infectar, e matar, camundongos imunocompetentes após inoculação pela via i.c. Para tal finalidade, o isolado viral foi submetido a 29 passagens de sucessivas em linhagem celular mantida em condições de cultura. Nestas condições esperávamos que os vírus acumulassem mutações em genes estruturais e não estruturais que aumentassem a capacidade de replicação em células o que levaria à redução da neurovirulência em animais imunocompetentes. A seleção de mutações adaptativas permite obter cepas virais capazes de infectar e replicar em novas condições. De fato, o processo de adaptação viral tem sido empregado como base para a seleção de linhagens virais capazes de infectar diferentes hospedeiros ou para a seleção de variantes atenuados obtidos após passagens sucessivas em cultura de células (VELANDIA et al., 2008).

Nos ensaios feitos observamos que após 29 repiques em células de inseto, diversas mutações foram detectadas nas sequências de proteínas estruturais (M e E) e não estruturais (NS1, NS4B e NS5). Em alguns desses sítios (E, NS1 e NS5) notamos um polimorfismo natural nas sequências de aminoácidos no isolado JHA1. Esse resultado indica que o isolado consiste em uma mistura de variantes genéticas que poderiam apresentar capacidades diferenciadas em infectar células em culturas, mas, e principalmente, expressar a neurovirulência em camundongos imunocompetentes. Esse resultado também vai de encontro ao conceito de quasispécies em que populações virais dinâmicas, eventualmente com propriedades biológicas distintas, coexistem em ambientes naturais ou de laboratório (BRACKNEY et al., 2015; DOMINGO et al., 2012; PRESLOID; NOVELLA, 2015).

Nossos dados indicam que alguns aminoácidos de proteínas do JHA1 alteraram suas proporções relativas na população viral analisada após as diferentes etapas experimentais conduzidas. Além dos sítios polimórficos previamente identificados no isolado original, notamos que após as passagens em células C6/36, outros sítios polimórficos nas proteínas M e NS4B foram

identificados. Além disto, a distribuição relativa das formas polimórficas das proteínas E, NS1 e NS5 sofreram alterações significativas. No entanto, nenhuma dessas alterações na distribuição relativa de formas polimórficas, após às 29 passagens em células Vero, foi alterada após uma única passagem em cérebro de camundongo neonato, condição na qual o vírus recuperou plenamente a capacidade de neurovirulência. Nestas condições a atenuação obtida após as passagens em cultura de células foi completamente restaurada. Esses resultados indicam que os sítios polimórficos identificados não apresentam uma relação direta com a neurovirulência do JHA1, corroborando com os achados por (AMORIM et al., 2012). Novas abordagens experimentais devem ser seguidas para que se possa associar uma base genética à capacidade de neurovirulência exacerbada do isolado JHA1.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou alternativas para a implantação de modelos experimentais de infecção pelo isolado JHA1 de DENV2, previamente descrito como sendo capaz de infectar camundongos imunocompetentes após inoculação pela via i.c. Embora não tenha sido possível estabelecer modelos de infecção que utilizem outras vias de inoculação, demonstramos que o isolado JHA1 é capaz de infectar camundongos da linhagem C57BL/c após inoculação pela via i.c. Tentativas de correlacionar a virulência do isolado JHA1 com mutações ou proporções relativas de formas isomórficas de proteínas estruturais e não estruturais codificadas pelo vírus não foram capazes de apontar uma base genética para a neurovirulência do JHA1.

REFERÊNCIAS*

- AKKINA, R. New generation humanized mice for virus research: Comparative aspects and future prospects. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 14–28, 2013.
- AMORIM, J. H. et al. A Genetic and Pathologic Study of a DENV2 Clinical Isolate Capable of Inducing Encephalitis and Hematological Disturbances in Immunocompetent Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–12, 2012.
- AMORIM, J. H. et al. Dengue virus models based on mice as experimental hosts. v. 10, p. 835–844, 2015.
- AN, J. et al. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. **Virology**, v. 263, p. 70–77, 1999.
- ABDELHAY, E. S. F. W. Criação e produção de animais transgênicos e nocautes. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. DE., Org. **Animais de laboratório**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. 345-352.
- BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses - an overview. **Infection ecology & epidemiology**, v. 3, p. 1–21, 2013.
- BARROS, V. E. et al. Differential replicative ability of clinical dengue virus isolates in an immunocompetent C57BL / 6 mouse model. **BMC Microbiology**, p. 1–11, 2015.
- BENTE, D. A et al. Dengue Fever in Humanized NOD / SCID Mice Dengue Fever in Humanized NOD / SCID Mice. **Journal of Virology**, v. 79, n. 21, p. 6–9, 2005.
- BENTE, D. A.; RICO-HESSE, R. Models of dengue virus infection. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 3, n. 1, p. 97–103, 2006.
- BIZZARRO, B. et al. Effects of Aedes aegypti salivary components on dendritic cell and lymphocyte biology. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 329, 2013.
- BLANEY, J. E. et al. Genetic basis of attenuation of dengue virus type 4 small plaque mutants with restricted replication in suckling mice and in SCID mice transplanted with human liver cells. **Virology**, v. 300, p. 125–139, 2002.
- BRACKNEY, D. E. et al. Modulation of Flavivirus Population Diversity by RNA Interference. v. 89, n. 7, p. 4035–4039, 2015.
- BRAY, M. et al. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. **Journal of virology**, v. 72, n. 2, p. 1647–1651, 1998.
- BUSCHMAN, E.; SKAMENE, E. Analysis of Genetic Susceptibility to Infection in Mice. 1999.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CAPEDING, M. R. et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia : a phase 3 , randomised , observer-masked , placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1358–1365, 2014.
- CHAN, K. W. K. et al. Animal models for studying dengue pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 123, p. 5–14, 2015.
- CHATURVEDI, U. C. et al. Host defence mechanisms against dengue virus infection of mice. **The Journal of general virology**, v. 39, n. 1973, p. 293–302, 1978.
- CHATURVEDI, U. C.; TANDON, P.; MATHUR, A. Effect of immunosuppression on dengue virus infection in mice. **The Journal of general virology**, v. 36, p. 449–458, 1977.
- CHOKEPHAIBULKIT, K.; PERNG, G. C. Challenges for the formulation of a universal vaccine against dengue. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 238, p. 566–78, 2013.
- CISALPINO, D. et al. A Model of DENV-3 Infection That Recapitulates Severe Disease and Highlights the Importance of IFN- γ in Host Resistance to Infection. v. 6, n. 5, p. 12–15, 2012.
- CLAPHAM, H. E. et al. Modelling Virus and Antibody Dynamics during Dengue Virus Infection Suggests a Role for Antibody in Virus Clearance. p. 1–15, 2016.
- COSTA, S. M. et al. Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 18–19, 2011.
- COSTA, V. G. et al. Safety , immunogenicity and efficacy of a recombinant tetravalent dengue vaccine : A meta-analysis of randomized trials. **Vaccine**, v. 32, n. 39, p. 4885–4892, 2014.
- COSTA, V. V. et al. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- γ in host resistance to infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. 12–15, 2012.
- COX, J. et al. Mosquito Bite Delivery of Dengue Virus Enhances Immunogenicity and Pathogenesis in Humanized Mice. **Journal of Virology**, v. 86, n. 14, p. 7637–7649, 2012.
- DOMINGO, E. et al. Viral Quasispecies Evolution. v. 76, n. 2, p. 159–216, 2012.
- DUVAL, B. Y. C. W.; HARRIS, W. H. Studies upon the etiology of Dengue Fever. II. Cultivation and Nature of the virus. 1924.
- EDELMAN, R. Dengue Vaccines Approach the Finish Line. v. 21201, n. DV, p. 0–4, 2007.
- ENDY, T. P. Dengue human infection model performance parameters. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. Suppl 2, 2014.
- ERHARDT, W. et al. A Comparative Study with Various Anesthetics in Mice (Pentobarbitone, Ketamine-Xylazine, Carfentanyl-Etomidate). p. 159–169, 1984.
- FERREIRA, G. P. et al. Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of

- virulence in experimental mice infection. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 12, p. 546–554, 2010.
- GUABIRABA, R. Dengue virus infection : current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. p. 143–156, 2013.
- GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, n. 3, 1998a.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998b.
- GUY, B. et al. From research to phase III : Preclinical , industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7229–7241, 2011.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S7–S16, 2010.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The Dengue Viruses. v. 3, n. 4, p. 376–396, 1990a.
- HENCHAL, E. A; PUTNAK, J. R. The Dengue Viruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 4, p. 376–396, 1990b.
- HOTTA, S. EXPERIMENTAL STUDIES ON DENGUE. **OXFORD JOURNAL**, v. 90, n. 1, p. 1–9, 1952.
- HUANG, K. et al. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. p. 2177–2182, 2000.
- JOHN, A. L. S.; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 6, p. 420–426, 2013.
- JOHNSON, A J.; ROEHRIG, J. T. New mouse model for dengue virus vaccine testing. **Journal of virology**, v. 73, n. 1, p. 783–786, 1999.
- KIRKPATRICK, B. D. et al. Robust and Balanced Immune Responses to All 4 Dengue Virus Serotypes Following Administration of a Single Dose of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine to Healthy , Flavivirus-Naive Adults. v. 212, 2015.
- LARSEN, C. P.; WHITEHEAD, S. S.; DURBIN, A. P. Development. **Vaccine**, 2015.
- LAUREN E. YAUCH AND SUJAN SHRESTA. Mouse models of dengue virus infection and disease. **Antiviral research**, v. 80, n. 2, p. 87–93, 2008.
- LEONG, A. S.-Y. et al. The pathology of dengue hemorrhagic fever. **Seminars in diagnostic pathology**, v. 24, p. 227–236, 2007.
- MARCOS, E. et al. Dengue encephalitis-associated immunopathology in the mouse model : Implications for vaccine developers and antigens inducer of cellular immune response. **Immunology Letters**, v. 176, p. 51–56, 2016.
- MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus

- pathogenesis: An integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564–581, 2009.
- MATHEW, A.; TOWNSLEY, E.; ENNIS, F. A. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. **Future microbiology**, v. 9, p. 411–25, 2014.
- MORRISON, J.; GARCÍA-SASTRE, A. STAT2 signaling and dengue virus infection. **Jak-Stat**, v. 3, p. e27715, 2014.
- MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 299–309, 2013.
- MURRELL, S.; WU, S.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 239–247, 2011.
- NOISAKRAN, S.; PERNG, G. C. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 233, p. 401–408, 2008.
- OLIVEIRA, E. R. A. et al. Peripheral effects induced in BALB/ c mice infected with DENV by the intracerebral route. **Virology**, v. 489, p. 95–107, 2016.
- PAES, M. V. et al. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. **Virology**, v. 338, p. 236–246, 2005.
- PHARES, T. W. et al. CD4 T Cells Promote CD8 T Cell Immunity at the Priming and Effector Site during Viral Encephalitis. p. 2416–2427, 2012.
- PLOTKIN, S. History of vaccination. v. 111, n. 34, p. 12283–12287, 2014.
- PLUMMER, E. M.; SHRESTA, S. Mouse models for dengue vaccines and antivirals. **Journal of Immunological Methods**, v. 410, p. 34–38, 2014.
- PRESLOID, J. B.; NOVELLA, I. S. RNA Viruses and RNAi: Quasispecies Implications for Viral Escape. p. 3226–3240, 2015.
- PRINCE, R. et al. Production of a Recombinant Dengue Virus 2 NS5 Protein and Potential Use as a Vaccine Antigen. v. 23, n. 6, p. 460–469, 2016.
- PUCCIONI-SOHLER, M.; ROSADAS, C. Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 8, p. 698–703, 2015.
- RAJMANE, Y. et al. Infant mouse brain passaged Dengue serotype 2 virus induces non-neurological disease with inflammatory spleen collapse in AG129 mice after splenic adaptation. **Virus Research**, v. 173, n. 2, p. 386–397, 2013.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 2773–2786, 2010.
- SABCHAREON, A. et al. Protective efficacy of the recombinant , live-attenuated , CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren : a randomised , controlled

phase 2b trial. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1559–1567, [s.d.].

SABIN, A. B.; SCHLESINGER, W. R. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, v. 101, n. 2634, p. 640–642, 1945.

SALVADOR, F. S. **Investigação de Mutações Adaptativas no vírus da Dengue em diferentes sistemas de cultivo**. 2016. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, 2016.

SANTOS, J. H. A. **Desenvolvimento de vacinas de subunidades contra a dengue baseadas no domínio III da proteína E e na proteína NS1 recombinantes**. 2012. 78 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2012.

SARATHY, V. V. et al. A Lethal Murine Infection Model for Dengue Virus 3 in AG129 Mice Deficient in Type I and II Interferon Receptors Leads to Systemic Disease. **Journal of Virology**, v. 89, n. 2, p. 1254–1266, 2015a.

SARATHY, V. V et al. Mouse models of dengue virus infection for vaccine testing. v. 33, p. 7051–7060, 2015b.

SCHERER, W. F. et al. Experimental infection of chimpanzees with dengue viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 590–599, 1978.

SIMMONS, M. et al. Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 5, p. 655–662, 1998.

TAN, G. K. et al. A non mouse-adapted dengue virus strain as a new model of severe dengue infection in AG129 mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, 2010.

VELANDIA, M. L. et al. Neurovirulence and Neurosusceptibility: Clues to Understanding Flavivirus- and Dengue-Induced Encephalitis. 2008.

VIGILÂNCIA, S. DE. Epidemiológico. v. 47, p. 1–10, 2016.

WATANABE, S. et al. Dengue virus infection with highly-neutralizing levels of cross-reactive antibodies cause acute lethal small intestinal pathology without high level of viremia in mice. **Journal of Virology**, v. 89, n. 11, p. JVI.00216-15, 2015.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. July, p. 518–528, 2007.

WILLIAMS, K. L. et al. A mouse model for studying dengue virus pathogenesis and immune response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1171, p. 12–23, 2009.

WU, S. J. L. et al. Evaluation of the severe combined immunodeficient (SCID) mouse as an animal model for dengue viral infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 5, p. 468–476, 1995.

YAMANAKA, A.; KONISHI, E. A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. **Vaccine**, v. 27, p. 3735–3743, 2009.

ZELLWEGER, R. M.; SHRESTA, S. Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. April, p. 1–9, 2014.

ZOMPI, S.; HARRIS, E. Animal models of dengue virus infection. **Viruses**, v. 4, p. 62–82, 2012.

APÊNDICES – Artigos de periódicos

APÊNDICE A - SALVADOR, F. S.; AMORIM, J. H.; ALVES, R. P. S.; **PEREIRA, S. A.**; FERREIRA, L. C. S.; ROMANO, C. M. Complete genome sequence of an atypical dengue viral serotype 2 lineage isolated in Brazil. *Genome Announcements*. v. 3, 2015.

APÊNDICE B – AMORIM, J. H.; ALVES, R. P. S.; BIZERRA, R.; **PEREIRA, S. A.**; PEREIRA, L. R. ; FABRIS, D. L. N. ; SANTOS, R. A.; ROMANO, C. M. ; FERREIRA, L. C. S. Antibodies are not required to a protective immune response against dengue virus elicited in a mouse encephalitis model. *Virology*. v. 487, p. 41-49, 2016.

APÊNDICE A



Complete Genome Sequence of an Atypical Dengue Virus Serotype 2 Lineage Isolated in Brazil

Felipe Scassi Salvador,^a Jaime Henrique Amorim,^b Rubens Prince Santos Alves,^b Sara A. Pereira,^b Luis Carlos Souza Ferreira,^b Camila Malta Romano^a

São Paulo Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil^a; Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil^b

Here, we report the complete polyprotein sequence of a dengue virus 2 strain isolated in Brazil. This virus belongs to the American genotype and has the ability to cause neurovirulence in immunocompetent adult mice. The data presented here may help understand the genetic determinants responsible for neurovirulence.

Received 8 June 2015 Accepted 12 June 2015 Published 16 July 2015

Citation Salvador FS, Amorim JH, Alves RPS, Pereira SA, Ferreira LCS, Romano CM. 2015. Complete genome sequence of an atypical dengue virus serotype 2 lineage isolated in Brazil. *Genome Announc* 3(4):e00779-15. doi:10.1128/genomeA.00779-15.

Copyright © 2015 Salvador et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Camila Malta Romano, cmromano@usp.br.

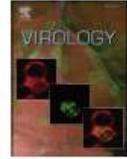
APÊNDICE B

Virology 487 (2016) 41–49



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro

Antibodies are not required to a protective immune response against dengue virus elicited in a mouse encephalitis model



Jaime Henrique Amorim^{a,*}, Rúbens Prince dos Santos Alves^a, Raíza Bizerra^a, Sara Araújo Pereira^a, Lennon Ramos Pereira^a, Denicar Lina Nascimento Fabris^a, Robert Andreato Santos^a, Camila Malta Romano^b, Luís Carlos de Souza Ferreira^{a,*}

^a Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, Brasil

^b Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Faculdade de Medicina, Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias (IMHC), Universidade de São Paulo, Brasil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2015

Returned to author for revisions

28 September 2015

Accepted 5 October 2015

Keywords:

Dengue
Nonstructural proteins
Immune response
T lymphocytes
Antibodies

ABSTRACT

Generating neutralizing antibodies have been considered a prerequisite to control dengue virus (DENV) infection. However, T lymphocytes have also been shown to be important in a protective immune state. In order to investigate the contribution of both humoral and cellular immune responses in DENV immunity, we used an experimental model in which a non-lethal DENV2 strain (ACS46) is used to intracranially prime Balb/C mice which develop protective immunity against a lethal DENV2 strain (JHA1). Primed mice generated envelope-specific antibodies and CD8⁺ T cell responses targeting mainly non-structural proteins. Immune sera from protected mice did not confer passive protection to naive mice challenged with the JHA1 strain. In contrast, depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes significantly reduced survival of ACS46-primed mice challenged with the JHA1 strain. Collectively, results presented in this study show that a cellular immune response targeting non-structural proteins are a promising way in vaccine development against dengue.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.