

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

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 present 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 infection, Flavivirus

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 (CAPEADING 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).

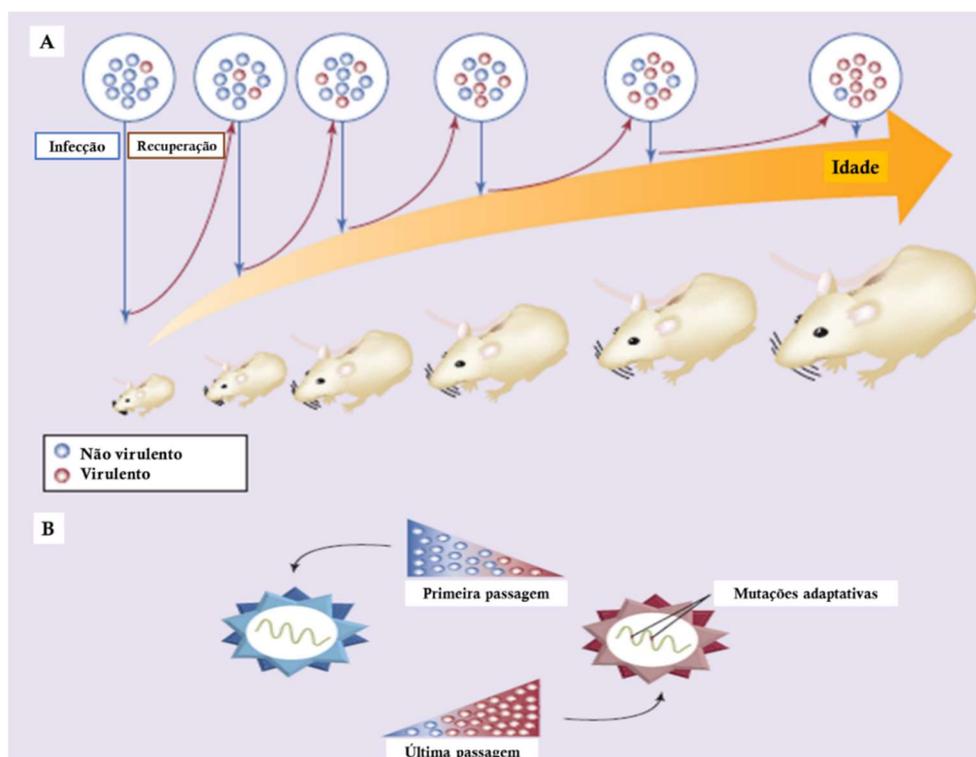


Figura 1 - Adaptação viral após passagens sequenciais em camundongos. (A) Cepa viral inoculada e recuperada de cérebro de camundongos neonatos, sendo posteriormente inoculados em camundongos mais velhos. Esse processo é repetido até que o vírus provoque letalidade em camundongos adultos. (B) Seleção 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 às aquelas 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.

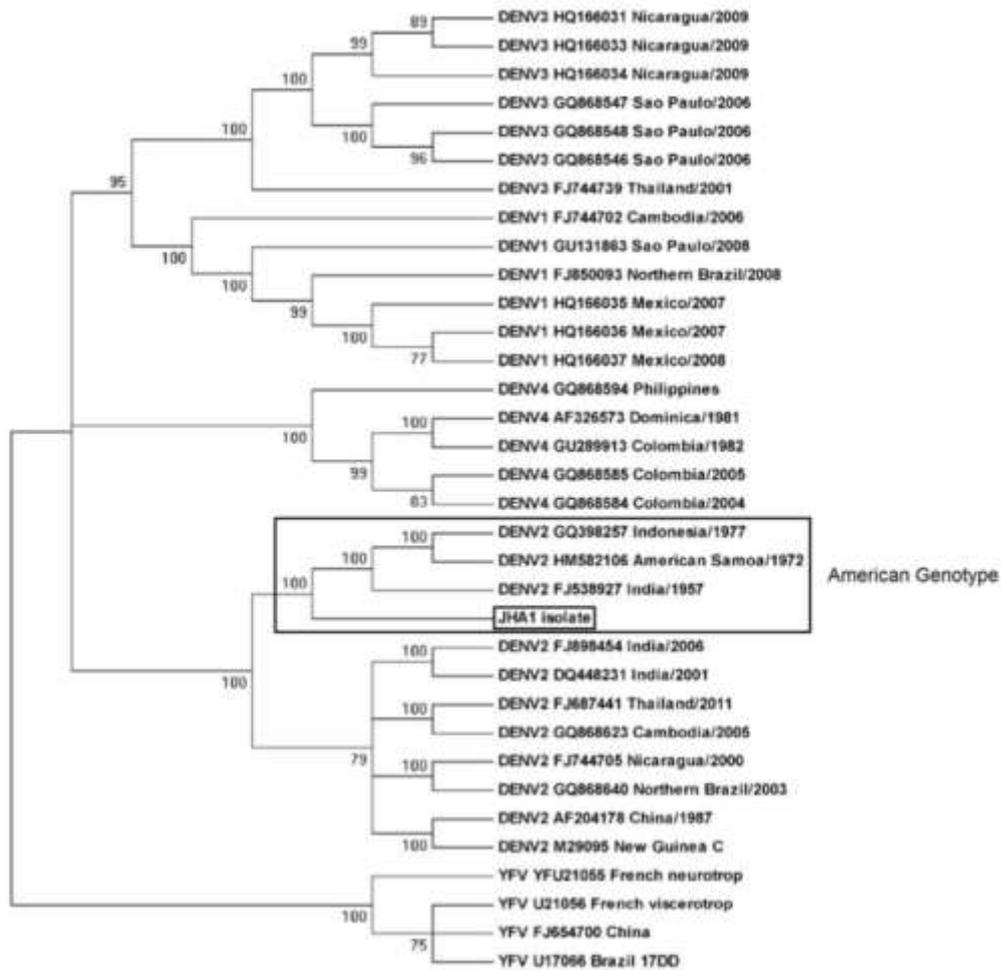


Figura 2 - Árvore filogenética do DENV sorotipo 2 JHA1. Árvore filogenética demonstrando (retângulo) que o JHA1 está agrupado no DENV-2, com base em sequências nucleotídicas da proteína EIII (proteína do Envelope – domínio III) e na proteína NS1 (não estrutural). Modificado de Amorim, J. H. et al. 2012.

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.