

CARLA ELIZABETH CUNHA MACHADO

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO HUMANIZADO EM CAMUNDONGOS
NOD-SCID IL-2R γ ^{null} (NSG) COM POTENCIAL TRANSLACIONAL PARA
AVALIAÇÃO DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Maio/2021

CARLA ELIZABETH CUNHA MACHADO

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO HUMANIZADO EM CAMUNDONGOS
NOD-SCID IL-2R γ ^{null} (NSG) COM POTENCIAL TRANSLACIONAL PARA
AVALIAÇÃO DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
graduação em Biologia Celular do Departamento de
Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Vivian Vasconcelos Costa Litwinski

Coorientadora: Michelle Adriane Amantéa Sugimoto

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Maio/2021

043

Machado, Carla Elizabeth Cunha.

Estabelecimento de um modelo humanizado em camundongos NOD-SCID IL-2R γ null (NSG) com potencial translacional para avaliação de novos alvos terapêuticos [manuscrito] / Carla Elizabeth Cunha Machado. - 2021.

96 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Vivian Vasconcelos Costa Litwinski. Coorientadora: Michelle Adriane Amantéa Sugimoto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Dengue/etiologia. 3. Camundongos transgênicos. 4. Drogas em Investigação. I. Litwinski, Vivian Vasconcelos Costa. II. Sugimoto, Michelle Adriane Amantéa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
CARLA ELIZABETH CUNHA MACHADO**

342/2021
entrada
1º/2019
2019690068

Às **nove horas** do dia **28 de maio de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO HUMANIZADO EM CAMUNDONGOS *NOD/SCID IL-2ry^{null}* (NSG) COM POTENCIAL TRANSLACIONAL PARA AVALIAÇÃO DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Vivian Vasconcelos Costa**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Vivian Vasconcelos Costa	UFMG	Aprovada
Dra. Michelle Adriane Amantéa Sugimoto - Coorientadora	UFMG	Aprovada
Dra. Vanessa Pinho da Silva	UFMG	Aprovada
Dra. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 28 de maio de 2021.**

Dr^a. Vivian Vasconcelos Costa (Orientadora)

Dr^a. Michelle Adriane Amantéa Sugimoto- Coorientadora

Dr^a. Vanessa Pinho da Silva

Dr^a. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura

DEDICATÓRIA

A Deus, toda honra, toda glória, todo o louvor! Me sustentou e me trouxe até aqui!

Aos meus pais, Carlos e Clívia, por serem meu porto seguro, a base da minha vida;

Aos meus irmãos Carin, Léo e Davi, pelo companheirismo e presença;

Às minhas sobrinhas Giovana, Laura e Luísa, que são os presentes mais lindos que eu poderia sonhar em ter um dia;

À minha Susi e meu Tico, companheiros inseparáveis em todos os momentos;

À algumas mulheres poderosas, inteligentes e lindas:

- Minha orientadora, Professora Vívian Vasconcelos Costa Litwinski – por me aceitar e acreditar em mim. Por me incentivar a ir mais longe e caminhar comigo.
- Minha primeira co-orientadora, Dra. Gisele Olinto Libânio Rodrigues – por me ensinar os primeiros passos no laboratório com tanto carinho.
- Minha segunda co-orientadora, Dra. Michelle Adriane Amantéa Sugimoto – por continuar me ensinando, cheia de doçura e sabedoria.

Ingredy, Jôsy, Angélica, Layara, Celso, Matheus, que ativamente me ajudaram, doando tempo e amizade;

Ilma, Rose, Gil, Frank e Hermes que foram indispensáveis para a realização do trabalho;

A todos os colegas do G3, C4 e O4 que sempre estiveram presentes, com um sorriso no rosto;

A todos que passaram por mim e se foram, mas deixaram sua contribuição;

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq, INCT em dengue,

MINHA ETERNA GRATIDÃO!

“Porque desde a antiguidade não se ouviu, nem com ouvidos se percebeu, nem com os olhos se viu um Deus além de Ti que trabalha para aquele que n’Ele espera.”

Isaias 64:4

RESUMO

Estudos em humanos são limitados por questões éticas e técnicas. Dessa forma, o uso de camundongos como modelos *in vivo* e *ex vivo*, tem proporcionado grandes avanços nas pesquisas, porém ainda não são o suficiente. Assim, o desenvolvimento de camundongos humanizados (hu-camundongos) e sua utilização se faz relevante onde não há outro modelo animal adequado disponível para a pesquisa. Hu-camundongos são definidos como camundongos reconstituídos com células ou tecidos de origem humana e representam uma inovadora ferramenta de estudo *in vivo* do papel exercido pelo sistema imune humano durante a fisiopatologia de diferentes condições, assim como uma nova abordagem para o estudo da resposta imune humana com potencial translacional e avaliação de novos alvos terapêuticos, principalmente no que concerne a patógenos cujo tropismo é exclusivo das células humanas, como é o caso do vírus da dengue.

Assim sendo, o objetivo desse estudo foi estabelecer um modelo de sistema imune humano em camundongos *NOD-scid IL-2R γ ^{null}* (NSG) para avaliação de novos alvos terapêuticos contra a dengue. Para tanto, foram testadas e avaliadas três diferentes fontes de células humanas para humanização dos animais: 1) células tronco progenitoras CD34⁺ provenientes de fígado fetal humano; 2) células tronco progenitoras CD34⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese enriquecida com GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) e, 3) PBMC (células mononucleares do sangue periférico) humano de doadores saudáveis e seus respectivos controles não injetados. As duas primeiras estratégias não resultaram em resultados satisfatórios, o que inviabilizou a continuidade dos experimentos. Assim, a próxima fonte de células foi PBMC's humanos e, com este modelo, seguimos com os experimentos. Os animais NSG foram injetados com PBMC's e a presença de células humanas no sangue periférico dos animais foi avaliada semanalmente através de citometria de fluxo. Nossos resultados demonstram que os animais enxertados com PBMC's humanos apresentaram um percentual médio de reconstituição de células humanas CD45⁺ superior a 40%, critério utilizado para considerarmos a humanização satisfatória. A avaliação foi feita no sangue, baço e fígado e as células T foram o tipo celular predominantes encontrados nesses sítios. A avaliação histopatológica do fígado demonstrou um recrutamento celular composto por células humanas. Além disso, nossos dados demonstraram que a humanização a partir de PBMC's não foi associada a perda de peso, morte ou alterações nos parâmetros sanguíneos dos animais. Uma vez atingida a frequência média de 40% de células humanas circulantes, os camundongos

humanizados, doravante chamados hu-camundongos, foram infectados por DENV-2 (dengue vírus-2) e acompanhados os parâmetros inflamatórios, histopatológicos, hematológicos e clínicos. A infecção dos hu-camundongos não foi associada a perda de peso ou morte. No entanto, a avaliação dos parâmetros sanguíneos demonstrou que houve uma diminuição de monócitos e aumento de plaquetas no sangue dos animais infectados quando comparados aos não infectados. Entretanto, não houve diferença significativa no percentual de hematócrito e nos níveis circulantes de linfócitos e neutrófilos em relação aos grupos infectados versus não infectados. Adicionalmente, foi possível observar aumento na produção de $INF\gamma$ (interferon gama) somente nas células TCD4 do baço dos humanizados animais infectados. Os parâmetros histopatológicos avaliados revelaram que houve um recrutamento de células para o tecido e que essas células eram humanas. De modo geral, tal modelo parece ser uma boa estratégia para avaliação de novos alvos terapêuticos contra doenças virais com tropismo por células humanas, em especial, linfócitos humanos, e será mais explorado em nosso laboratório futuramente, podendo expandir nossas investigações para teste de outros patógenos com tropismo por células humanas.

Palavras-chave: Camundongos humanizados, dengue, patogênese, novas terapias

ABSTRACT

Human studies are limited by ethical and technical issues. Thus, the use of mice as in vivo and ex vivo models has provided great advances in research, but they are still not enough. Thus, the development of humanized mice (hu-mice) and their use becomes relevant where there is no other suitable animal model available for research. Hu-mice are defined as mice reconstituted with cells or tissues of human origin and represent an innovative in vivo study tool of the role played by the human immune system during the pathophysiology of different conditions, as well as a new approach to the study of the human immune response with translational potential and evaluation of new therapeutic targets, especially regarding to pathogens whose tropism is exclusive to human cells, such as the dengue virus.

Therefore, the aim of this study was to establish a human immune system model in NOD-scid IL-2R γ ^{null} (NSG) mice to evaluate new therapeutic targets against dengue. Therefore, three different sources of human cells for the humanization of animals were tested and evaluated: 1) CD34⁺ progenitor stem cells from human fetal liver; 2) CD34⁺ progenitor stem cells from a leukopheresis pouch enriched with GM-CSF (granulocyte and macrophage colony stimulating factor) and 3) human PBMC (peripheral blood mononuclear cells) from healthy donors and their respective non-injected controls. The first two strategies did not result in satisfactory results, which made the continuation of the experiments unfeasible. Thus, the next source of cells was human PBMC's and, with this model, we continued with the experiments. NSG animals were injected with PBMC's and the presence of human cells in the animals' peripheral blood was evaluated weekly by flow cytometry. Our results demonstrate that animals grafted with human PBMC's presented an average percentage of human CD45⁺ cell reconstitution higher than 40%, a criterion used to consider humanization satisfactory. The evaluation was done in blood, spleen and liver and T cells were the predominant cell type found in these sites. Histopathological evaluation of the liver demonstrated a cell recruitment composed of human cells. Furthermore, our data demonstrated that humanization from PBMC's was not associated with weight loss, death or changes in blood parameters of animals. Once the average frequency of 40% of circulating human cells was reached, the humanized mice, hereinafter called hu-mice, were infected by DENV-2 (dengue virus-2) and the inflammatory, histopathological, hematological and clinical parameters were monitored. Infection of mice hu was not associated with weight loss or death. However, the evaluation of blood parameters showed that there was a decrease in monocytes and an increase in platelets in the blood of infected animals when compared to non-infected ones. However, there was no significant

difference in the percentage of hematocrit and circulating levels of lymphocytes and neutrophils in relation to the infected versus non-infected groups. Additionally, it was possible to observe an increase in the production of INF γ (interferon gamma) only in the TCD4 cells of the spleen of humanized infected animals. The evaluated histopathological parameters revealed that there was a recruitment of cells to the tissue and that these cells were human. In general, this model seems to be a good strategy for evaluating new therapeutic targets against viral diseases with tropism for human cells, in particular human lymphocytes, and will be further explored in our laboratory in the future, which may expand our investigations to test other pathogens with tropism for human cells.

Keywords: Humanized mice, dengue, pathogenesis, new therapies

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hematopoiese.....	23
Figura 2: Distribuição geográfica dos casos de dengue no mundo até 2017.....	31
Figura 3: Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue, por semanas epidemiológicas de início de sintomas, Brasil, 2020 e 2021.....	32
Figura 4: Ciclo de replicação dos Flavivírus.....	34
Figura 5: Estrutura do genoma do Dengue vírus.....	35
Figura 6: Ciclo epidêmico da transmissão do Dengue vírus.....	36
Figura 7: Classificação dos sinais clínicos de dengue.....	37
Figura 8: Fases da evolução da doença.....	38
Figura 9: Esquema ilustrativo para obtenção de células progenitoras CD34 ⁺ provenientes de fígado fetal humano por beads magnéticas.....	43
Figura 10: Foto ilustrativa da "nuvem" de leucócitos formada após a separação por gradiente de ficoll.....	45
Figura 11: Células progenitoras CD34 ⁺ viáveis obtidas a partir de amostras de fígado fetal humano.....	54
Figura 12: Isolamento e viabilidade após processamento das células CD34 ⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese de pacientes adultos.....	55
Figura 13: Avaliação do potencial de reconstituição de camundongos NSG a partir de células-tronco hematopoiéticas CD34 ⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese.....	57
Figura 14: Estratégia de humanização e caracterização do perfil celular no sangue periférico de camundongos NSG enxertados com PBMC humano proveniente de doadores saudáveis.....	59
Figura 15: Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e histopatológicos dos animais humanizados a partir de PBMC humano proveniente de doadores saudáveis.....	61
Figura 16: Avaliação do perfil de leucócitos humanos no sangue periférico, fígado e baço de camundongos NSG inoculados com PBMC's humanos de doadores saudáveis.....	63
Figura 17: Avaliação do fenótipo dos leucócitos humanos circulantes no sangue periférico de animais NSG ao longo do tempo após a inoculação dos PBMC's.....	64
Figura 18: Infecção dos camundongos NSG pelo Dengue vírus.....	66
Figura 19: Leucócitos humanos provenientes de camundongos humanizados não são ativados pela infecção por DENV-2 in vivo, exceto em linfócitos TCD4 no baço, que respondem produzindo INF γ	68

Figura 20: Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e histopatológicos dos animais humanizados e infectados com Dengue vírus.....	70
Figura 21: Avaliação da expressão da proteína NS3 viral em leucócitos humanos de camundongos humanizados e infectados pelo Dengue vírus.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estratégias para humanização de camundongos NSG.....	27
Tabela 2: Características de modelos murinos de infecção pelo dengue vírus usados em estudos pré-clínicos.	29
Tabela 3: Informações sobre as amostras de fígado fetal recebidos.....	42
Tabela 4: Resultado de IgG-dengue por doador.....	45
Tabela 5: Parâmetros de escore histopatológico.....	50
Tabela 6: Anticorpos utilizados nas marcações.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ACK – *Ammonium – Chloride - Potassium*

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* – Síndrome da Imundeficiência Adquirida

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCRJ – Banco de Célula do Rio de Janeiro

BOD – *Biochemistry Oxygen Demand* – Demanda bioquímica de oxigênio

BSA – *Bovine Serum Albumin* – albumina de soro bovino

CD – *Cluster of Differentiation* – grupamento de diferenciação

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CMC – Carboximetilcelulose

CTH – células tronco hematopoiéticas

DENV – Dengue vírus

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagles's Medium*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – *Ethylene Diamine Tetracetic Acid* – Ácido etilenodiamino tetra-cético

ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EPM – Erro padrão da média

EUA – Estados Unidos da América

FACS – *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FD – febre do dengue

FHD – Febre hemorrágica do dengue

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FOXN1 – *Forkhead box protein N1*

GM-CSF – *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* - Fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos

H&E – Hematoxilina e Eosina

HC/BH – Hospital das Clínicas de Belo Horizonte

HLA – *Human leukocyte antigen* – Antígeno leucocitário humano

HSC – *Human Stem Cell* – célula tronco humana

i.v. – intravenoso

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – *Interleukin* - Interleucina
IFN γ – *Interferon gamma*
MPO – Mieloperoxidase
NK – *Natural Killer*
NOD – *Non Obese Diabetic* (diabético não obeso)
NSG – *NOD-scid IL-2R γ ^{null}*
OD – *Optical density* – Densidade óptica
OPD – *O-Phenylenediamine Dihydrochloride* – Orto-fenilenodiamina
p.i. – pós infecção
p/v – peso/volume – unidade de medida de concentração
PBMC – *Peripheral blood mononuclear cell* – Células mononucleares do sangue periférico
PBS – *Phosphate-Buffered Saline* – Solução salina tamponada com fosfato
PFU – *Plaque Forming Unit* – Unidade formadora de placa
pg – picograma
PNH – primatas não humanos
PRKDC – *Protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit* - subunidade catalítica da proteína quinase ativada pelo DNA
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*
RT-PCR – *Real Time Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SCD – Síndrome do choque da dengue
SCID – *Severe combined immunodeficiency* – Imunodeficiência combinada grave
SFB – Soro Fetal Bovino
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF – *Tumor Necrose Factor* – Fator de Necrose Tumoral
TRL – *Toll-like receptor* – receptor tipo toll
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UV – Ultravioleta
v/v – volume por volume
 γ c – *gamma chain* – cadeia gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES	20
3. FONTES DE CÉLULAS PARA HUMANIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS HU-CAMUNDONGOS RECONSTITUÍDOS COM ESSAS CÉLULAS.....	23
3.1 Células tronco hematopoiéticas (CTH)	23
3.2 Fígado fetal humano	24
3.3 Bolsa de leucoaférese	25
3.4 Células mononucleares do sangue periférico – PBMC	26
4. CAMUNDONGOS HUMANIZADOS.....	26
5. A DENGUE	30
5.1 Replicação viral.....	32
5.2 Estrutura do genoma viral.....	34
5.3 Ciclo de transmissão.....	35
5.4 Patogênes.....	37
6 JUSTIFICATIVA	39
7 OBJETIVOS	40
7.1 Objetivo geral	40
7.2 Objetivos específicos.....	40
8 MATERIAIS E MÉTODOS	41
8.1 Animais.....	41
8.2 Definição da taxa de humanização.....	42
8.3 Obtenção de células progenitoras CD34 ⁺ provenientes de fígado fetal humano.	42
8.4 Obtenção de células progenitoras CD34 ⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese.....	44
8.5 Obtenção de células mononucleares a partir do sangue periférico – PBMC – provenientes de doadores saudáveis.....	44
8.6 Determinação dos níveis de anticorpos específicos IgG – anti-dengue dos doadores de PBMC's pelo ensaio de ELISA.	45
8.7 Propagação e concentração do Dengue vírus.	45
8.8 Determinação da carga viral por ensaio de titulação viral.....	46
8.9 Infecção dos camundongos.....	47
8.10 Citometria de fluxo para quantificação viral da proteína NS3 do vírus.....	47
8.11 Acompanhamento de peso e letalidade	48

8.12	Análise hematológica	48
8.13	Análise histopatológica	49
8.14	Análise histoquímica para hCD45.....	50
8.15	Citometria de fluxo para avaliação de células CD34 ⁺ provenientes de fígado fetal e células de bolsa de leucoaférese.	51
8.16	Citometria de fluxo para avaliação de células CD45 ⁺ e subpopulações no sangue, baço e fígado..	51
8.17	Análises estatísticas.....	52
9	RESULTADOS	52
9.1	As células progenitoras humanas CD34 ⁺ purificadas a partir de fígado fetal humano apresentaram baixa viabilidade, inviabilizando seu uso para geração de animais humanizados.	52
9.2	As células progenitoras humanas CD34 ⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese apresentaram bom rendimento e viabilidade, mas falharam em induzir humanização nas condições testadas.	54
9.3	Avaliação da reconstituição de células CD34 ⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese em camundongos NSG.	56
9.4	Estratégia de humanização e caracterização do perfil celular no sangue periférico de camundongos NSG a partir da injeção de PBMC's humanos provenientes de doadores saudáveis.....	57
9.5	Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e histopatológicos dos animais humanizados a partir de PBMC humano proveniente de doadores saudáveis.	59
9.6	O perfil de leucócitos após a humanização com PBMC's no sangue e em outros órgãos foi inteiramente de linfócitos.	62
9.7	Avaliação dos tipos celulares ao longo da cinética após inoculação dos PBMC's.	63
9.8	Infecção de camundongos humanizados pelo Dengue vírus.	65
9.9	Avaliação da expressão do marcador de ativação INF γ por leucócitos humanos provenientes de camundongos humanizados após a infecção por DENV-2.	66
9.10	Parâmetros clínicos, hematológicos e histopatológicos dos animais humanizados e infectados por DENV-2.	68
9.11	Avaliação da carga viral nos camundongos hu-PBMC's.	71
10	DISCUSSÃO	73
11	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

A ciência é feita de observação, experimentação e resultados. A observação de uma situação pode levar a uma conclusão, porém, para se conhecer os mecanismos intrínsecos, se aprofundar e obter resultados, deve-se experimentar (BERNARD, 1957).

Animais têm sido utilizados como sujeitos experimentais em pesquisas, testes e educação desde a antiguidade (GOLDIM; RAYMUNDO, 1997, STEPHENS; GOLDBERG; ROWAN, 2001). Um dos primeiros estudos utilizando modelos animais para a avaliação de doenças humanas data do século 18, quando Pasteur inoculou o líquido da medula espinal de cães e coelhos portadores do vírus da raiva – *Rabies vírus* – em animais saudáveis e, posteriormente em humanos, dando início à nova era da imunologia (GOUVEIA-MATOS, 1997; FAGUNDES; TAHA, 2004). Somente em 1876, no Reino Unido, a primeira lei a regulamentar o uso de animais em pesquisas foi proposta (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016, GOLDIM; RAYMUNDO, 1997). Durante as últimas décadas, o uso de animais vem sendo bastante debatido entre ativistas, organizações de proteção aos animais e cientistas (MATTHIESSEN; LUCARONI; SACHEZ, 2003). Em 1959, William Russell e Rex Burch, zoologista e microbiologista respectivamente, propuseram em seu livro “*The Principles of Humane Experimental Technique*”, o modelo dos 3R’s na pesquisa com animais: *Replace*, *Reduce* e *Refine* (substituir, reduzir e aperfeiçoar), o que não impedia a pesquisa com animais, apenas sugeria a adequação no sentido de aprimorá-la (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016, GOLDIM; RAYMUNDO, 1997). Tais termos significam, de forma simplificada, a busca de métodos alternativos *in vitro*, a redução dos animais utilizados nas pesquisas, e o aperfeiçoamento na condução do estudo (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004). No Brasil, em 2008, a Lei 11.794, também conhecida como Lei AROUCA foi criada e estabeleceu normas e diretrizes quanto a experimentação animal, determinando a adoção de práticas de pesquisa que respeitassem o bem-estar dos animais e de forma a protegê-los de experimentos e sofrimentos desnecessários, representando um grande avanço na legislação brasileira sobre o uso de animais para fins científicos (REGIS; CORNELIS, 2012, GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016).

Apesar das tentativas de se empregar o modelo dos 3R’s, reduzindo, substituindo e aprimorando, o modelo animal ainda é necessário, sendo amplamente utilizado na pesquisa básica e em praticamente todos os ramos da pesquisa científica biológica (LEGRAND *et al.*, 2009, DRAKE; CHEN; CHEN, 2012, SCHANAIDER; SILVA, 2004, REGIS; CORNELIS,

2012), favorecendo o entendimento de diversos processos biológicos, fisiológicos e patológicos humanos que necessitam uma análise em sistemas *in vitro* e *in vivo* (LAN *et al.*, 2006, SHULTZ; ISHIKAWA; GREINER, 2007) pois, estudos em humanos são limitados por questões éticas e técnicas (DAVIS, 2012; LEGRAND; WEIJER; SPITS, 2006).

O modelo murino vem sendo frequentemente utilizado devido ao pequeno porte, baixo custo, facilidade de realização de mutações genéticas, facilidade de manutenção e manuseio, além do curto ciclo reprodutivo (WALSH *et al.*, 2017, HUEY; NIEWIESK, 2018). No entanto, apesar de importantes resultados na pesquisa a partir desse modelo, as diferenças evolutivas e biológicas entre humanos e murinos são lacunas que ainda existem e necessitam ser preenchidas na translação dos resultados obtidos no laboratório para a clínica como, por exemplo, diferenças em diversos receptores, como a falta do receptor do tipo *Toll-10* (TLR-10 – *Toll-like receptor 10*) funcional em camundongos e a expressão de TLR-11, TLR-12 e TLR-13 presentes em camundongos e ausentes em humanos (WALSH *et al.*, 2017; AKKINA, 2013).

Como estratégia para o preenchimento dessas lacunas, surgiram os camundongos humanizados ou hu-camundongos. Tratam-se de camundongos reconstituídos com células ou tecidos de origem humana os quais foram desenvolvidos a partir da necessidade de se obter ferramentas capazes de reproduzir de forma mais fidedigna condições fisiológicas e patológicas humanas (JAISWAL *et al.*, 2009; DRAKE; CHEN; CHEN, 2012; LEGRAND *et al.*, 2009), bem como permitir a avaliação de potenciais alvos terapêuticos contra diversas doenças de importância médica, a saber câncer (HER *et al.* 2017; ITO *et al.* 2009; MERAZ *et al.* 2018), doenças autoimunes (GUNAWAN *et al.* 2017; YOUNG *et al.* 2015; ZAYOUD *et al.* 2013), doença do enxerto versus hospedeiro – GvHD (KING *et al.* 2008; TOBIN *et al.* 2013; ZHAO *et al.* 2015) e doenças infecciosas (AMALADOSS *et al.* 2015; FRIAS-STAHILI *et al.* 2014; KENG *et al.* 2015, JAISWAL *et al.*, 2009; DRAKE; CHEN; CHEN, 2012; LEGRAND *et al.*, 2009).

Dessa forma, os modelos de hu-camundongos representam uma inovadora e viável ferramenta de estudo, *in vivo*, do papel exercido pelo sistema imune humano durante a fisiopatologia de diferentes condições, principalmente no que concerne a patógenos cujo tropismo é exclusivo das células de linhagem humana (eg. HIV, Dengue, HCV, *plasmodium falciparum* entre outros) (AKKINA, 2013; COSTA *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2014; LEGRAND *et al.*, 2009; SRIDHARAN *et al.*, 2013; THOMAS *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2015).

Assim, o presente trabalho buscou estabelecer modelos de hu-camundongos a partir da injeção de células humanas de diferentes fontes (fígado fetal, bolsa de leucoaférese, cordão umbilical e/ou células mononucleares de sangue periférico (PBMC) gerando um modelo *in vivo*

o qual poderá ser utilizado para se estudar mecanismos celulares e moleculares da resposta inflamatória de doenças infecciosas que, no caso deste trabalho, terá como alvo o modelo de infecção pelo vírus da dengue.

2. CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES

A evolução gradual das linhagens de camundongos imunodeficientes permitiu a geração de modelos humanizados mais complexos (AKKINA, 2013) e, desde então, pesquisadores procuram desenvolver e aprimorar um modelo murino que mimetize de maneira fidedigna o funcionamento celular do sistema imune humano, envolvendo componentes estruturais, moleculares e celulares, após o enxerto bem-sucedido com células e/ou tecidos primários de origem humana (ITO *et al.*, 2002; BREHM *et al.*, 2016).

A partir da descrição do camundongo *nude* por Flanagan (1966), células e tecidos humanos funcionais vêm sendo extensivamente estudados (BREHM *et al.* 2010, ITO *et al.* 2008). Esses animais possuem um gene recessivo FOXP1, localizado no cromossomo 11 e animais homocigotos para esse gene apresentam o fenótipo de falta de pelos (SZADVARI *et al.* 2016). Adicionalmente, camundongos *nude* apresentam ausência ou falha no desenvolvimento do timo, o que resulta em um sistema imune comprometido, com redução de células T (MECKLENBURG *et al.* 2005, SZADVARI *et al.* 2016). Entretanto, esses animais ainda apresentam células NK e macrófagos, sendo capazes de desenvolver uma rápida resposta imune inata contra o enxerto humano. Sendo assim, não são permissivos a uma reconstituição duradoura de células humanas (AKKINA, 2013). No entanto, a identificação desse animal contribuiu para o início do desenvolvimento de um modelo murino mais eficaz na pesquisa de doenças humanas (ITO *et al.* 2002), sendo utilizado para estudos sobre câncer de cólon (KOOSHA *et al.* 2019, SZADVARI *et al.* 2016), e câncer gástrico (QIAO *et al.* 2019).

Em seguida, a linhagem de camundongos NOD (*non obese diabetic* – diabético não obeso), estabelecida por Makino *et al.* (1980) representou mais um avanço em direção ao aprimoramento de um modelo animal que melhor suportasse o enxerto de células e tecidos humanos. Animais NOD desenvolvem diabetes espontânea e súbitamente, apresentando hiperglicemia (elevação da glicose no sangue), poliúria (alta frequência urinária) e glicosúria (presença de glicose na urina) acompanhadas de perda de peso, assim como defeitos na apresentação de antígeno, no repertório de linfócitos e na função de células NK (MAKINO *et al.* 1980, KIKUTANE; MAKINO, 1992, ZENG, 2017). A descrição desse modelo permitiu o estudo e o entendimento da patogênese e da genética do *Diabetes mellitus* fornecendo estratégias direcionadas para terapias, controle e tratamento dessa doença. Importante ressaltar

que células NK fazem parte do sistema imune inato e respondem rapidamente à infecção (KATAOKA *et al.* 1983).

Posteriormente, Bosma e colaboradores (1983) identificaram em uma linhagem de camundongos C.B-17, uma mutação herdável e sob controle do gene recessivo PRKDC (*Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit* – subunidade catalítica da proteína quinase ativada pelo DNA) e observaram que PBMC's humanos, tecidos hematopoiéticos fetais e células tronco hematopoiéticas (CTH) poderiam ser então enxertados nesses animais. Essa mutação foi identificada como *SCID* (do inglês *Severe Combined Immunodeficiency* – Imunodeficiência Combinada Severa). Camundongos que portam essa mutação apresentam defeito no reparo do DNA devido à mutação no gene PRKDC e, portanto, deficientes no rearranjo do receptor de células T e B resultando em células não funcionais, contribuindo para o sucesso de enxertos alogênicos ou xenogênicos (ZHANG; DUAN; ZHAO, 2009, McCUNNE *et al.* 1988; ITO *et al.* 2002, SHULTZ; ISHIKAWA; GREINER, 2007). No entanto, o enxerto ocorre em apenas um nível muito baixo por ainda apresentarem imunidade residual, incluindo células NK, macrófagos e granulócitos (HESELTON *et al.* 1995, ZHANG; DUAN; ZHAO, 2009; PEARSON, GREINER, SHULTZ, 2008, SHULTZ; ISHIKAWA; GREINER, 2007).

Para desenvolver uma linhagem de camundongos imunodeficientes com múltiplos defeitos na imunidade adaptativa e inata, animais que portavam mutação *SCID* foram cruzados com o background NOD, resultando em um modelo NOD/*SCID* cujas funções das células T e B apresentavam defeitos (GREINER *et al.* 1995) e suportavam níveis mais altos de enxerto de PBMC's (HESELTON *et al.* 1995). No entanto, a presença de macrófagos e atividade residual de células NK, combinada com uma vida útil reduzida devido ao desenvolvimento de linfomas no timo, limitava a utilidade deste modelo, podendo interferir na eficiência do enxerto (AKKINA, 2013; HESELTON *et al.* 1995, KING *et al.* 2008, ITO *et al.* 2002).

O maior avanço no desenvolvimento de um modelo que permitisse o enxerto bem-sucedido de células e/ou tecidos humanos, capaz de suportar a reconstituição de níveis mais elevados de células hematopoiéticas humanas do que o modelo anterior – NOD/*SCID* – ocorreu quando, para eliminar geneticamente a atividade das células NK, uma mutação completa do gene da cadeia gama comum do receptor de citocina IL-2 (*IL-2R γ c*) foi introduzida no modelo NOS/*SCID* (SHULTZ *et al.* 2010, PEARSON, GREINER, SHULTZ, 2008; AKKINA, 2013). Esse gene codifica componentes de sinalização essenciais para a ação de várias citocinas, tais como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 (AKKINA, 2013; SCHULTZ *et al.* 2007; ITO *et al.* 2008; ANDRE *et al.* 2010). A interrupção da sinalização dessas citocinas impede o

desenvolvimento das células NK, permitindo um maior e mais bem sucedido enxerto de células e tecidos humanos (AKKINA, 2013).

A esses animais, foi dada a descrição NOD/SCID/IL-2 γ ^{null} (NSG) portanto, animais extremamente imunodeficientes, não possuindo linfócitos T, linfócitos B, células NK além de defeitos funcionais na atividade de macrófagos e na função das células dendríticas (NAGATANI *et al.* 2019). Após o enxerto com células humanas, dependendo da origem dessas células, os camundongos NSG permitem a expansão de células do sistema imunológico humano em várias linhagens e são uma plataforma validada para estudos imuno-oncológicos (ITO *et al.* 2009) e pesquisa de doenças infecciosas (FOMIN *et al.* 2017, SHULTZ *et al.*, 2010). Esse modelo representou um salto tecnológico na geração de animais imunodeficientes capazes de suportar a reconstituição de células humanas (PEARSON, GREINER, SHULTZ, 2008). No entanto, a ocorrência do fenômeno de GvHD é uma complicação comumente presente após a humanização e potencialmente letal que precisa ser evitada nestes animais (ALI *et al.*, 2012). O desenvolvimento de GvHD nos hu-camundongos é dependente da xeno-reatividade de células humanas com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e classe II (MHC I e II) do hospedeiro (ALI *et al.*, 2012; KING *et al.*, 2009). Animais que desenvolvem GvHD apresentam sinais clínicos como erupção cutânea (AZEVEDO, 2010) perda de peso, eriçamento de pelos, arqueamento de dorso, diarreia, anemia, trombocitopenia, culminando em altos níveis de mortalidade (ALI *et al.* 2012, KING *et al.*, 2009).

Em contrapartida, o sucesso da reconstituição do tecido humano está associado ao suporte apropriado de fatores do hospedeiro (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) os quais favorecem a reconstituição das células e/ou tecidos enxertados no correto microambiente tecidual (LEGRAND *et al.*, 2009; CHEN; KHOURY; CHEN, 2009). Somado a isso, estudos utilizando camundongos humanizados sugerem a ablação da medula através de irradiação na tentativa de criar um nicho para que as células progenitoras hematopoiéticas transplantadas possam reconstituir o sistema imune recém enxertado (COVASSIN *et al.* 2013, COSTA *et al.* 2017, REIS, VISENTAINER, 2004).

Algumas doenças humanas as quais a ausência de tratamento específico e o incompleto conhecimento sobre sua patogênese impõem grandes desafios aos sistemas de saúde, vêm sendo estudadas extensivamente em animais NSG humanizados. Dentre elas, podem ser citadas: HIV (BRAINARD *et al.* 2009), algumas arboviroses (COX *et al.* 2015), doenças autoimunes (GUNAWAN *et al.* 2017), certos tipos de câncer (HER *et al.* 2017), GvHD (ZHAO *et al.* 2015) dentre outras (WALSH *et al.*, 2017; BREHM; SHULTZ; GREINER, 2010, SHULTZ;

ISHIKAWA; GREINER, 2007; LAN *et al.*, 2006; AKKINA, 2013; BREHM *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2017).

3. FONTES DE CÉLULAS PARA HUMANIZAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS HU-CAMUNDONGOS RECONSTITUÍDOS COM ESSAS CÉLULAS.

3.1 Células tronco hematopoiéticas (CTH)

Células tronco hematopoiéticas (CTH's) são responsáveis pela hematopoiese, ou seja, a produção de células sanguíneas que ocorre continuamente durante a vida de um organismo e possuem a característica de pluripotência e autorrenovação com potencial de desenvolvimento para dar origem a todos os tipos de células sanguíneas maduras funcionais (MENDRONE JUNIOR, 2009; NG; ALEXANDER, 2017; BROXMEYER *et al.*, 1989; SUMIDE *et al.*, 2018), sendo responsáveis pela manutenção e homeostase da hematopoiese (IVANOVA *et al.* 2002, SERTORIO *et al.* 2017) (Figura 1). Dessa forma, células indiferenciadas podem responder a sinais do microambiente do tecido hospedeiro e se diferenciar para produzir progênie com as características fenotípicas das células maduras do local (WANG *et al.*, 2008).

A produção de células sanguíneas ao longo da vida é dependente de células tronco hematopoiéticas e a maturação dessas células é gerada a partir de progenitores hematopoiéticos (NOTTA *et al.* 2011). As principais fontes de células tronco hematopoiéticas são medula óssea (MORRISON; SCADDEN, 2014), fígado fetal (RONGVAUX *et al.* 2014), sangue periférico mobilizado (ANDRÉ *et al.* 2010) e cordão umbilical (BROXMEYER *et al.* 1989).

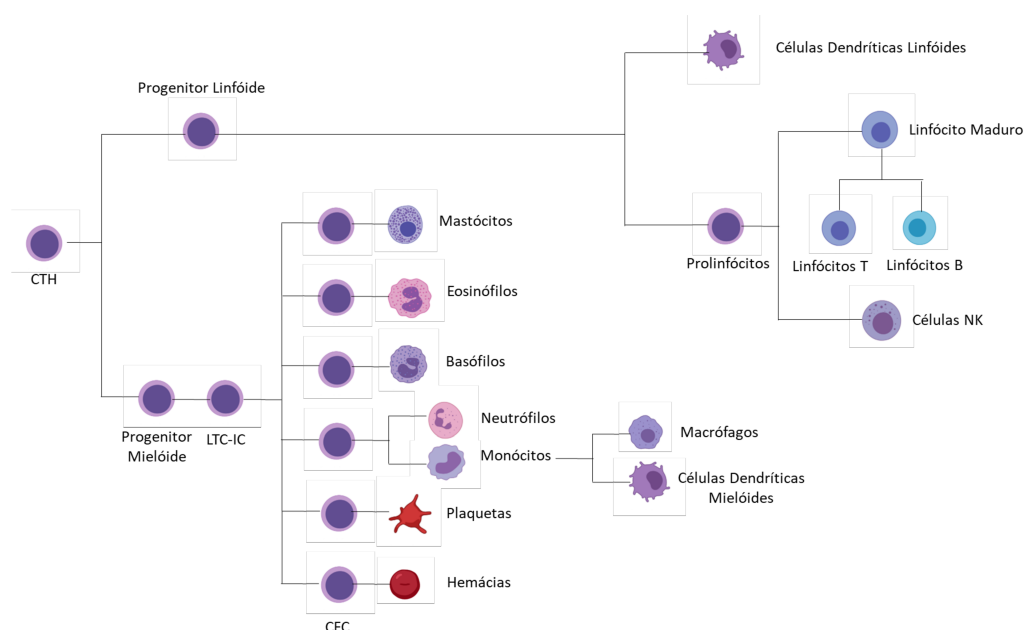


Figura 1: Hematopoiese.

A hematopoiese normal é organizada de maneira hierárquica a partir de uma pequena população de células tronco hematopoiéticas. Estas células dão origem a linhagens progenitoras capazes de proliferar e diferenciar em diferentes linhagens celulares. LTC-IC (*long-term colony-initiating cell*), CFC (*colony-forming cells*). Adaptado de Corey *et al.* (2007).

Como um dos principais marcadores antigênicos da população de células tronco hematopoiéticas, pode-se citar o CD34, uma fosfoglicoproteína transmembrana, presente em células progenitoras hematopoiéticas imaturas (SIDNEY *et al.* 2014) que, por sua vez, têm a capacidade de auto renovação e alto potencial proliferativo, o que possibilita sua diferenciação em linhagens celulares maduras (GROTTO; NORONHA, 2003, YAMAMOTO *et al.* 2013). Tal capacidade faz das células progenitoras, alvos de interesse para estudos em terapias gênicas e celulares (NOTTA *et al.* 2011). A função de CD34 está ligada inibição ou facilitação da adesão, proliferação celular e regulação da diferenciação (SIDNEY *et al.* 2014).

3.2 Fígado fetal humano

O fígado é um importante órgão composto por diferentes populações de células imunes com maior proporção de células inatas incluindo células NK, macrófagos e células dendríticas, as quais apresentam importante papel nas respostas imunes (GUO *et al.* 2018). Durante o desenvolvimento pré-natal, uma das principais fontes de células progenitoras CD34⁺ é o fígado fetal, sendo o principal nicho hematopoiético no feto até o sexto mês de gestação (FOMIN *et al.* 2017, GAO; LIU, 2018, GUO *et al.*, 2018), se tornando um importante órgão imune em adultos (NAKAGAKI *et al.* 2018). Com base na sua grande capacidade de expansão *ex vivo*, assim como no seu potencial de diferenciação, as células tronco progenitoras CD34⁺ podem ser vistas como ferramentas úteis no desenvolvimento de hu-camundongos para o estudo de doenças infecciosas humanas (NAKAGAKI *et al.* 2018). O transplante de células CD34⁺ provenientes de fígado fetal humano resulta, de forma confiável, no desenvolvimento de células T, B, NK, macrófagos e células dendríticas humanas (BILLERBECK *et al.* 2016, DUAN *et al.* 2011, CHEN *et al.* 2009).

Em 1990, Golfier e colaboradores sugeriram que, independentemente da idade gestacional, parece não haver diferenças significativas no número de células progenitoras totais, sugerindo que a expansão de células progenitoras no fígado atinja um platô após a décima sexta semana de gestação. No entanto, estudos recentes demonstram que células progenitoras provenientes de fígado fetal com idades variando de 18 a 24 semanas apresentam níveis elevados de CD34⁺ (DUAN *et al.* 2011, GUO *et al.* 2018, LAN *et al.* 2018) e vêm sendo bastante utilizadas para a construção de hu-camundongos com o objetivo de pesquisar sobre o

desenvolvimento de células imunes humanas (MELKUS *et al.* 2006), doenças virais (MELKUS *et al.* 2006), HIV (DENTON *et al.* 2008), EBV (MELKUS *et al.* 2006). O uso dessa fonte tem crescido devido à abundância de células obtidas a partir de uma única amostra (80 a 280 milhões de células CD34⁺) (DRAKE, CHEN, CHEN, 2012).

Por fim, animais humanizados com células progenitoras de fígado fetal humano demonstram alta proporção de células humanas CD45⁺ não só no sangue periférico (85%) (DRAKE, CHEN, CHEN, 2012), mas também no baço, e linfonodos (GONZALES, STRBO, PODACK, 2013).

3.3 Bolsa de leucoaférese

A aférese é um termo amplo, aplicável a qualquer procedimento que envolva a remoção do sangue total do doador/paciente e sua separação em componentes. Portanto, através da aférese é possível retirar do sangue apenas os componentes de interesse. Submetido à centrifugação, o sangue é separado em seus componentes primários: plasma (plasmaférese), plaquetas (plaquetaférese), glóbulos brancos (leucoaférese) e glóbulos vermelhos (eritroaférese). O restante do sangue é, então, devolvido ao doador/paciente (CASTILLO, 2018). Bastante utilizada na clínica, a leucoaférese é uma forma efetiva para evitar a hiperleucocitose (glóbulos brancos acima de 100.000/ μ L de sangue), reduzindo o número de leucócitos circulantes para prevenir hiperviscosidade em casos de leucemia (VILLGRAN *et al.* 2016).

Em estudo conduzido por André e colaboradores (2010), o transplante de células progenitoras CD34⁺ provenientes de bolsas de leucoaférese em camundongos NSG suplementado com a citocina IL-7 humana, demonstrou enxerto robusto e diferenciação em múltiplas linhagens celulares, incluindo células NK e linfócitos, sendo a maior parte dos linfócitos T do tipo CD4 e, em menor número, CD8. Shultz e colaboradores (2005) verificaram a reconstituição de células CD45⁺ humanas na medula dos camundongos NSG, incluindo linfócitos B, células NK, células mieloides e células dendríticas plasmocitóides.

Uma grande vantagem no uso de células progenitoras CD34⁺ mobilizadas por leucoaférese é a possibilidade de usar informações médicas dos doadores no estudo da genética de doenças específicas (DRAKE, CHEN, CHEN, 2012). No entanto, a qualidade da reconstituição varia baseado na idade do animal a ser transplantado e outros fatores clínicos do doador, assim como a natureza invasiva do procedimento de coleta das células limita a aprovação desse protocolo tendo em vista outros métodos menos invasivos (DRAKE, CHEN, CHEN, 2012).

3.4 Células mononucleares do sangue periférico – PBMC

O sangue é um dos tecidos com maior capacidade regenerativa, com aproximadamente um trilhão (10^{12}) de células surgindo diariamente na medula óssea de um humano adulto (DOULATOV *et al.*, 2012).

Células mononucleares do sangue periférico (do inglês *peripheral blood mononuclear cells* – PBMC) compreendem os linfócitos (células B, células T e células NK), monócitos e células dendríticas, e são o material biológico humano mais prontamente acessível, além de uma importante fonte para elucidar novos biomarcadores da resposta imune em seres humanos. Adicionalmente, as células mononucleares são importantes no processo da infecção e apresentação antigênica (CAIMARI *et al.* 2010). A reconstituição com PBMC's é o método mais simples para o desenvolvimento de camundongos humanizados, por ser um método de fácil obtenção e processamento relativamente simples, porém, não são células progenitoras, ou seja, não se diferenciam em outros subtipos celulares.

A falta de um sistema imune murino intacto facilita a reconstituição temporária das células humanas, particularmente altos níveis linfócitos humanos funcionais, em todos os órgãos (SKELTON *et al.*, 2018). O modelo hu-PBMC também permite o enxerto de baixos níveis de linfócitos B, porém sem produção de anticorpos. No entanto, esse modelo não permite a diferenciação hematopoiética em outros subtipos celulares, especialmente componentes da imunidade inata, uma vez que as células injetadas já se encontram diferenciadas (AKKINA, 2013). Por fim, células T humanas injetadas podem ser rapidamente ativadas à medida que reconhecem as células murinas, levando ao desenvolvimento de GvHD, tornando este modelo adequado para estudos de doenças humanas com curta janela experimental (4-8 semanas) (BREHM *et al.* 2012, SKELTON *et al.*, 2018).

4. CAMUNDONGOS HUMANIZADOS

Alguns patógenos humanos são incapazes de infectar pequenos animais, limitando as pesquisas a animais cuja genética é mais próxima à dos humanos, como os primatas não humanos (PNH), ou a estudos observacionais (BILLERBECK *et al.* 2016). Assim, cientistas buscam um modelo animal que mimetize de maneira mais fidedigna a biologia humana na tentativa de ampliar os conhecimentos e avançar na pesquisa para a translação para a clínica (BREHM *et al.* 2016).

Hu-camundongos como modelos pré-clínicos para o estudo *in vivo* das células e tecidos humanos vêm sendo desenvolvidos há alguns anos (BREHM; SHULTZ; GREINER, 2010) e

são ferramentas importantes para o estudo da biologia humana (LEPUS *et al.*, 2009). Dessa forma, hu-camundongos podem ser entendidos como modelos biológicos construídos e/ou manipulados para a representação de respostas imunes humanas e oferecem grandes vantagens no estudo de vários patógenos humanos (BISCHUR, 2008; AKKINA, 2013). Adicionalmente, podem ser classificados como camundongos de linhagens imunocompetentes geneticamente modificados expressando genes humanos ou camundongos imunodeficientes enxertados com células ou tecidos de origem humana hematopoiéticas e linfoides (PEARSON; GREINER; SHULTZ, 2008; BREHM; SHULTZ; GREINER, 2010; DRAKE; CHEN; CHEN, 2012). Importante ressaltar que as diferenças entre o sistema imune do animal e as respostas do hospedeiro durante a infecção devem ser levadas em consideração (ST. JOHN, ABRAHAM, GUBLER, 2013).

Neste contexto, múltiplas plataformas e abordagens para o enxerto de sistemas imunológicos humanos para gerar hu-camundongos têm sido propostas como demonstrado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Estratégias para humanização de camundongos NSG.

Abordagem	Método	Animais	Vantagens	Desvantagens	Aplicações	Referência
Células progenitoras CD34 ⁺ provenientes de fígado fetal.	Injeção i.v. de células CD34 ⁺	Animais adultos (6-8 semanas) ou neonatos (24-36 horas).	Permite a diferenciação em vários tipos celulares T, B, NK, neutrófilos, macrófagos, dendríticas)	Questões éticas e dificuldade na aquisição de amostras humanas. Pode necessitar irradiação prévia ao enxerto.	HIV, Dengue, Doenças autoimunes	COVASSIN <i>et al.</i> 2013; BRAINARD <i>et al.</i> 2009; CUI <i>et al.</i> 2017; GUNAWAN <i>et al.</i> 2017.
Células progenitoras CD34 ⁺ provenientes de sangue de	Injeção i.v. de células CD34 ⁺	Animais jovens (2 semanas), adultos (8-	Permite a diferenciação em vários tipos celulares.	Reconstituição é demorada (12-16 semanas).	Câncer	ANDRÉ <i>et al.</i> 2010; HER <i>et al.</i> 2017.

bolsa de leucoaférese.		12 semanas)	Permite estudos de longa duração.	Pode necessitar irradiação prévia ao enxerto.		REIS <i>et al.</i> 2019
PBMC – Peripheral blood mononuclear cells – células mononucleares do sangue periférico	Injeção i.v. de células mononucleares do sangue periférico	Animais adultos (6-8 semanas)	Fácil obtenção, preparação e injeção. Rápido enxerto de linfócitos. Estudos de curta duração. Não necessita irradiação prévia.	Não permite a diferenciação em outros tipos celulares. Janela experimental curta devido ao desenvolvimento de GvHD (4-8 semanas) devido à GvHD (4-8 semanas).	Doenças infecciosas, como Síndrome de Sjogren; Câncer; GvHD	AKKINA, 2013; YOUNG <i>et al.</i> 2015; FISCHER <i>et al.</i> 2019; MORILLON <i>et al.</i> 2020; EH X <i>et al.</i> 2018.

Adaptado de AKKINA, 2013

Neste contexto, hu-camundongos são ferramentas ideais para se estudar microrganismos cujo tropismo é específico para células de origem humana (eg. HIV, Dengue, HCV, *Plasmodium falciparum*), dentre outros. (AMALADOSS *et al.* 2015; BRAINARD *et al.* 2009; AKKINA 2013).

Seja como for, a escolha do modelo adequado deve ser cuidadosa e levar em consideração a pergunta que se quer responder (BREHM *et al.* 2016). No presente projeto, optamos por utilizar o vírus da dengue, um arbovírus de extrema importância epidemiológica no mundo, como ferramenta para validar a utilização do modelo humanizado implementado em nosso laboratório.

Atualmente, os modelos existentes para o estudo dessa arbovirose, utilizam animais imunocomprometidos, como o modelo AG129 deficiente para o receptor dos interferons do tipo I (ST. JOHN, ABRAHAM, GUBLER, 2013) ou utilizam o vírus adaptado ao camundongo

(ROTHMAN, 2011; SOUZA *et al.* 2009; FAGUNDES *et al.* 2011; COSTA *et al.* 2012; COSTA *et al.* 2013; COSTA *et al.* 2014) ou modelos de hu-camundongos (Tabela 2). Mais especificamente, no contexto de modelos humanizados, Jaiswal e colaboradores (2009) e Mota; Rico-Hesse (2009, 2011) indicam que os camundongos enxertados com CTH's humanas provenientes de sangue de cordão umbilical são permissivos à infecção pelo DENV e geram respostas imunes humanas específicas para o DENV. Semelhantemente, Cui e colaboradores (2017) observaram a produção de anticorpos anti-DENV nos camundongos. Ainda, estudos conduzidos por Sridharan e colaboradores (2013) demonstraram que hu-camundongos a partir de células CD34⁺ provenientes de fígado fetal humano e infectados pelo DENV desenvolveram infecção sistêmica caracterizada por sinais e sintomas característicos das formas clássicas da doença a exemplo de trombocitopenia específica para as plaquetas humanas, leucopenia transitória, viremia e dano hepático. Utilizando o mesmo modelo, Costa e colaboradores (2017) demonstraram que células NK são essenciais à proteção do hospedeiro frente à infecção pelo DENV em hu-camundongos por mediar efeitos antivirais dependentes da secreção de INF γ .

Tabela 2: Características de modelos murinos de infecção pelo dengue vírus usados em estudos pré-clínicos.

Linhas	Características	Vantagens	Desvantagens	Aplicabilidade	Referências
Camundongos humanizados (camundongos SCID, NOD/SCID, NSG)	Camundongos Reconstituídos com células tronco hematopoiéticas (fígado fetal)	Animais desenvolvem sistema imune funcional, estudo da resposta humana frente à infecção.	Apresentam manifestações brandas da doença	Estudo da patogênese da FD, tropismo por células humanas, estudos de candidatos vacinais	COSTA <i>et al.</i> 2017
Camundongos imunocomprometidos AG129 (ausência de receptores para INF α e γ)	Camundongos infectados com isolados clínicos de dengue vírus ou animais adaptados aos isolados clínicos; alta viremia	Suportam replicação do vírus; desenvolvem viremia	Ausência de componentes críticos do sistema antiviral do hospedeiro; inadequado para estudos de avaliação das respostas imunes;	Investigar tropismo celular e tecidual do vírus da dengue, pesquisa de candidatos vacinais	MILLIGAN <i>et al.</i> 2017

				desenvolvimento de encefalite letal.	
Camundongos balb/c e C57BL/6j	Camundongos com sistema imune intacto com isolado viral adaptado	Camundongos desenvolvem manifestações de dengue severa (dores, trombocitopenia, hemoconcentração, permeabilidade vascular, hemorragia, viremia e recuperação de carga viral em órgãos alvo da infecção)	Modificação do vírus ao hospedeiro murino pode envolver mecanismos patológicos diferentes ao mecanismo patológico em humanos; doença severa ocorre em infecções primárias.	Estudo da patogênese da dengue severa, tropismo celular do vírus e respostas inflamatórias do hospedeiro frente à infecção	BYRNE <i>et al.</i> 2020

Adaptado de COSTA *et al.* 2013

5. A DENGUE

A dengue é uma doença viral de grande importância médica global e, dentre as arboviroses (doenças transmitidas por artrópodes – *Arthropod-borne virus*), é a principal causa de morbidade e mortalidade nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (GUZMAN *et al.*, 2010; JAISWAL *et al.*, 2009; KURANE *et al.*, 2011; HENCHAL, PUTNAK, 1990). Trata-se de um importante problema de saúde pública em todo mundo com um aumento significativo dos casos nas últimas três décadas (NARVAES *et al.* 2011).

Um dos primeiros relatos de dengue data de 1780, quando Benjamin Rush descreve em seu livro “*An Account Of The Remitting Fever*”, o surto de uma febre que ocorreu na Filadélfia naquele ano. Em suas anotações, Rush apresenta suas observações sobre uma febre que acometeu a cidade. Dentre os sintomas descritos, ele ressalta:

“As dores que acompanham esta febre são extremamente graves na cabeça, nas costas e nos membros. Alguns reclamaram de sua carne dolorida ao toque, em cada parte do corpo. Nessas circunstâncias, a doença, às vezes, acreditava-se ser um reumatismo;

mas seu nome mais geral entre todas as classes de pessoas era, FEBRE QUEBRASSOS” (RUSH, 1951).

Desde então, vários surtos de uma doença consistente com os sintomas da dengue vêm sendo reportados ao redor do mundo, sendo o continente Antártico, o único local onde os arbovírus não são endêmicos (LOPES *et al.* 2014). A descrição dos dois primeiros sorotipos de dengue (DENV-1 e DENV-2) ocorreu em 1943 no Japão e em 1945 no Havaí (MESSINA *et al.* 2014) e, atualmente, são conhecidos quatro sorotipos [DENV-1; DENV-2; DENV-3; DENV-4] e todos podem provocar tanto as formas mais brandas quanto as mais graves da doença (DANS *et al.* 2018, COSTA *et al.*, 2017; IOC, 2018). Tal diversidade de sorotipos torna o combate à doença mais complexo, uma vez que um indivíduo pode ser infectado mais de uma vez por sorotipos diferentes (ST. JOHN, RATHORE, 2019).

A perturbação ecológica causada pela Segunda Guerra Mundial, a globalização e as viagens internacionais, favoreceram a dispersão e transmissão do vírus ao redor do mundo (GUBLER, 1998, MESSINA *et al.* 2014) e a incidência global da dengue cresceu drasticamente (Figura 2). Aproximadamente metade da população mundial está em risco de contrair a doença, com aproximadamente 390 milhões de infecções por ano (ST. JOHN, RATHORE, 2019, WHO, 2021). Desses, 96 milhões manifestam algum nível de gravidade da doença e outros 3.9 bilhões de pessoas estão sob risco de infecção (WHO, 2021).

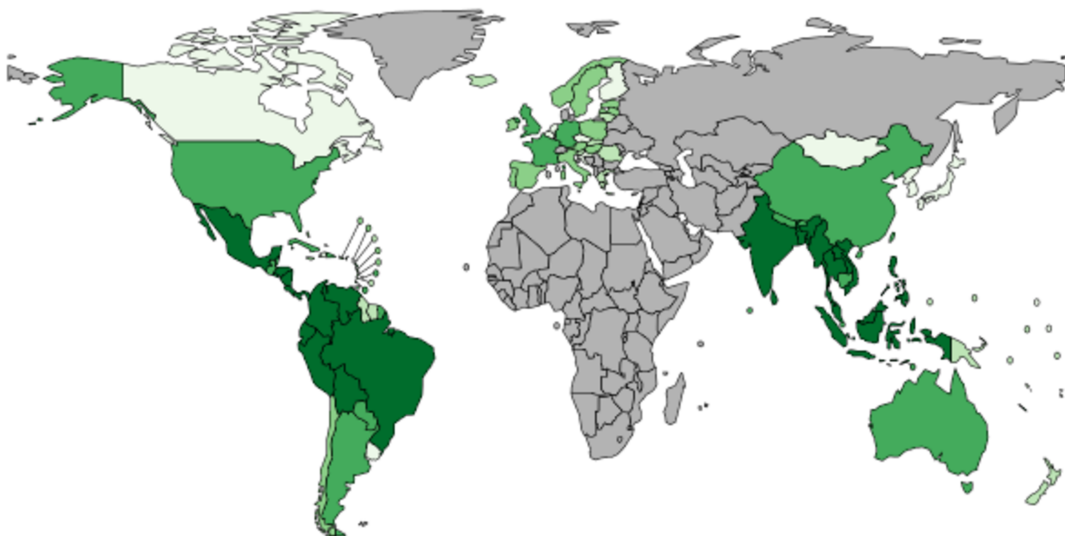


Figura 2: Distribuição geográfica dos casos de dengue no mundo até 2017.

Fonte: WHO, 2021.

No Brasil, nota-se um cenário epidemiológico complexo, com a co-circulação dos 4 sorotipos dos DENV e circulação simultânea dos vírus Chikungunya (CHIKV) a partir de 2014 e Zika (ZIKV) em 2015. De acordo com o Ministério da Saúde, até a semana epidemiológica 8 de 2021, foram notificados 72.093 casos prováveis (taxa de incidência de 34,0 casos por 100 mil habitantes) de dengue no Brasil. Em comparação com o ano de 2020, houve uma redução de 75% de casos registrados para o mesmo período analisado (Figura 3) (BRASIL, 2021). Ainda segundo o Ministério da Saúde, o país não enfrenta uma epidemia de dengue, pois os casos estão dentro do esperado. No entanto, essa redução pode ser atribuída a mobilização que as equipes de vigilância epidemiológica estaduais estão realizando diante do enfrentamento da emergência da pandemia do coronavírus (COVID-19), após a confirmação dos primeiros casos no Brasil em março de 2020, ocasionando em um atraso ou subnotificação para os casos das arboviroses (Figura 3) (BRASIL, 2021).

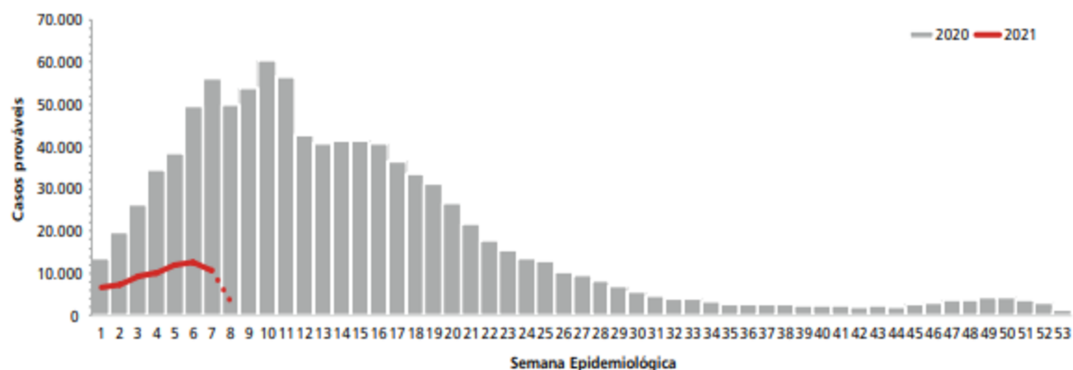


Figura 3: Curva epidêmica dos casos prováveis de dengue, por semanas epidemiológicas de início de sintomas, Brasil, 2020 e 2021.

Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, 2021

O vírus responsável pela doença é chamado de Dengue vírus (DENV), pertence à família Flaviviridae, do gênero *Flavivirus*. Este gênero inclui outros parasitas humanos transmitidos por mosquitos, dentre os quais destacam-se o vírus da Febre Amarela, o vírus do Nilo Oriental e o vírus da Encefalite Japonesa (GOULD *et al.* 2017). O vírus é transmitido ao homem via picada das fêmeas infectadas dos mosquitos do gênero *Aedes sp.* (GUZMAN *et al.*, 2010; GUBLER, 1988; DANS *et al.* 2018).

5.1 Replicação viral

Após a picada no hospedeiro, tem início o ciclo replicativo (Figura 4), quando o vírion infecta células residentes como fibroblastos, células dendríticas (de Langerhans) na derme

(COSTA *et al.* 2017; ST. JOHN *et al.* 2013). Os mastócitos não são comumente infectados, mas contribuem para a imunopatogênese induzindo a liberação de mediadores vasoativos (e.g triptase, quimase, etc.) os quais contribuem para os eventos vasculares (ST JOHN *et al.*, 2013; 2015). A ligação e a adsorção do vírus na célula são mediadas por receptor. Porém, apesar dos esforços para determinar a(s) molécula(s) responsável(is) pelo reconhecimento do DENV pelas células alvo, um receptor específico para o vírus ainda não foi identificado (CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015). No entanto, alguns estudos *in vitro* propõem possíveis candidatos para esses receptores, incluindo glicosaminoglicanos, lectinas do tipo C, a molécula de adesão de células dendríticas (DC-SIGN), integrinas específicas do fígado e linfonodos (L-SIGN), o receptor de manose em macrófagos, o receptor de fosfolipídios CD300a, os receptores de fosfatidilcerina das células T com domínio imunoglobulina e mucina (TIM) e Tyro3, AXI e MERTK (TAM) (NGONO; SHRESTA, 2018). Os vírus são então endocitados em vesículas recobertas por clatrina e direcionados aos endossomos, onde o ambiente ácido induz a fusão do envelope do vírus com as membranas celulares do hospedeiro e permite a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Ocorre, então, a tradução do genoma de RNA senso positivo em RNA de sentido negativo que, por sua vez, serve de modelo para a síntese de nova fita de RNA de sentido positivo. As novas fitas de RNA podem iniciar novos ciclos de replicação ou serem montadas em novos vírions. Os novos vírions são, então, empacotados no retículo endoplasmático e transportados ao complexo de Golgi onde a clivagem da proteína precursora de membrana (prM) em proteína de membrana (M) gera partículas infecciosas maduras e são então liberadas via exocitose (CLYDE *et al.* 2006, FERNANDEZ-GARCIA *et al.* 2009, CHEN; LAI; YEH, 2018).

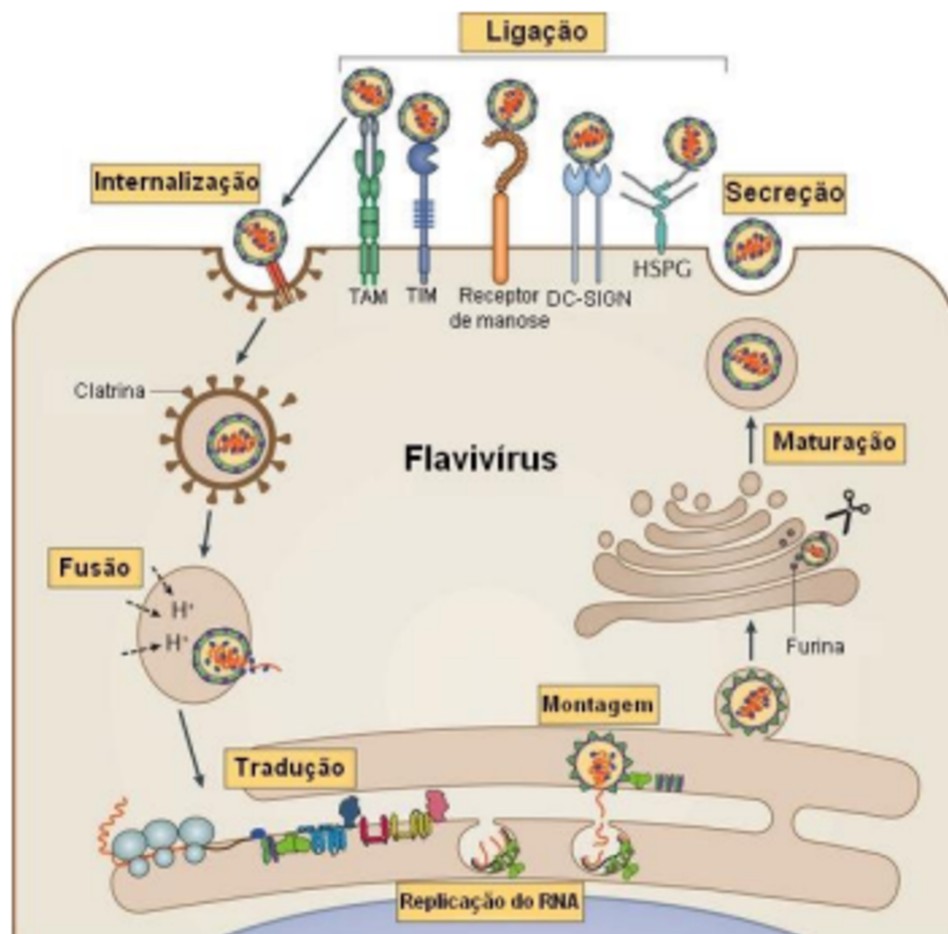


Figura 4: Ciclo de replicação dos Flavivírus.

Os vírus se ligam à membrana celular através de receptores e são endocitados. O pH baixo dentro dos endossomos provoca a fusão de membranas viral e celular, resultando na liberação do RNA viral. O genoma viral é traduzido em uma única poliproteína que é processada por proteases dos vírus e da célula hospedeira. O RNA é replicado por proteínas não-estruturais do vírus. A montagem dos vírions ocorre na membrana do retículo endoplasmático e a membrana dessa organela forma partículas virais imaturas. Partículas virais imaturas utilizam a via secretora da célula hospedeira e devido ao pH ácido do Complexo de Golgi a proteína precursora prM é clivada em proteína M, completando a maturação do vírus. Adaptado de Neufeldt (2018).

5.2 Estrutura do genoma viral

A partícula viral (Figura 5) é composta por um núcleo formado pelo nucleocapsídeo que contém o genoma viral, rodeado por uma bicamada lipídica contendo as proteínas estruturais do capsídeo (C), pró membrana (prM) e envelope (E) (GABRIEL *et al.* 2020). Trata-se de um vírus envelopado, de genoma de RNA senso positivo com aproximadamente 11kb de comprimento, com uma única janela de leitura possuindo o mesmo sentido do RNA mensageiro e, portanto, pode ser traduzido imediatamente após a infecção da célula hospedeira. O genoma codifica uma única poliproteína que é clivada em 10 proteínas diferentes, entre as quais três proteínas estruturais envolvidas na ligação, adsorção, montagem e secreção do vírus:

glicoproteínas do capsídeo (C), responsável pelo desnudamento e encapsulamento do genoma (GABRIEL *et al.* 2020), de membrana (M) e do envelope (E), responsáveis pelo empacotamento e internalização do vírus (NASAR *et al.* 2019) e sete proteínas não estruturais [NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5], envolvidas nas atividades enzimáticas, evasão imune e replicação viral (CHEN *et al.*, 2018; GUZMAN *et al.*, 2010, NASAR *et al.* 2019).

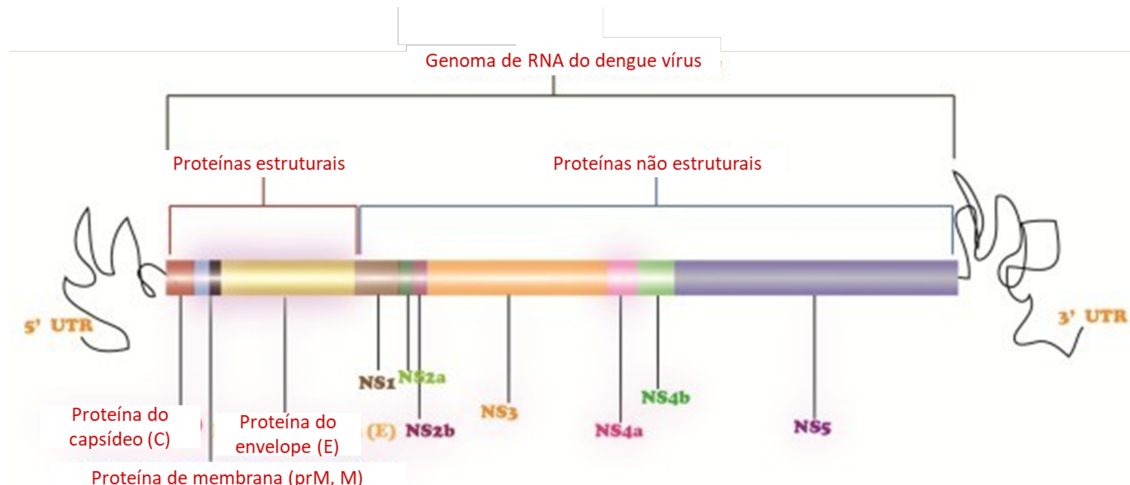


Figura 5: Estrutura do genoma do Dengue vírus.

O genoma é constituído por RNA de fita simples, sentido positivo com ~11 Kb. A poliproteína codifica 10 proteínas virais: 3 proteínas estruturais (C, M e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Adaptado de Idrees e Ashfaq (2012).

5.3 Ciclo de transmissão

A transmissão do vírus se inicia quando a fêmea do mosquito da espécie *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* faz o repasto sanguíneo a um indivíduo infectado (Figura 6) (WHITEHEAD *et al.* 2007). Uma vez dentro do artrópode, o vírus se replica no intestino médio, podendo ser encontrados também no ovário após algum tempo, estando disperso no sistema do vetor por um período médio de 8 a 12 dias, período chamado de incubação extrínseca (FERREIRA DE LIMA, LIMA-CÂMARA, 2018). Após esse período, o vírus alcança as glândulas salivares do artrópode, podendo ser transmitido a outros seres humanos durante novo repasto. Assim, o mosquito continua infectivo por toda sua vida (WHO, 2009). Na pele, os vírus infectam as células dendríticas imaturas através da ligação com receptores (eg. DC-SIGN). As células dendríticas maduras migram para os linfonodos onde apresentam os antígenos às células T, dando início às respostas celulares e humorais (GUZMAN *et al.* 2010). Devida a alta viremia causada pela infecção com o dengue, os vírus são transmitidos eficientemente entre mosquitos e humanos, não havendo necessidade de outro hospedeiro (WHITEHEAD *et al.* 2007).

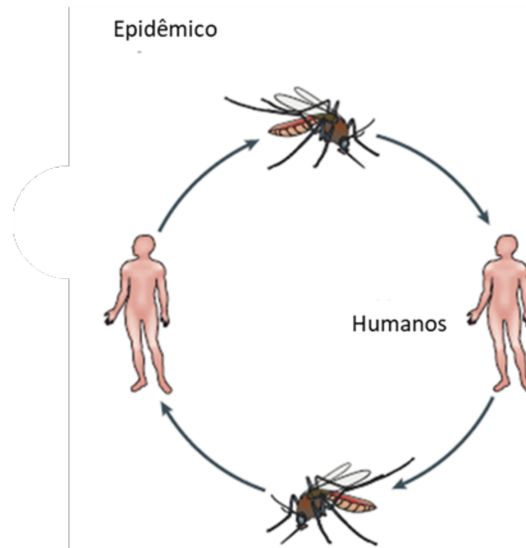


Figura 6: Ciclo epidêmico da transmissão do Dengue vírus.

Devido à alta viremia causada pela infecção do dengue vírus, a transmissão é eficiente entre humanos e mosquitos, sem a necessidade de outros hospedeiros. Adaptado de Whitehead *et al.* (2007).

A dengue é uma arbovirose com amplo espectro clínico, com sintomas podendo variar entre febre branda até febre hemorrágica e choque, podendo evoluir ao óbito (BRASIL, 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) adotava uma classificação dos casos de dengue mais tradicional, em três categorias: 1) febre do dengue (FD); 2) febre hemorrágica do dengue (FHD) e 3) síndrome do choque do dengue (SCD) (AJLAN *et al.* 2019, NARVAES *et al.* 2011). Porém, essa classificação não era sensível o bastante para detectar prováveis casos de dengue grave que exigiriam cuidados especiais ou internação e, portanto, uma nova classificação foi aprovada pela OMS em 2009 (AJLAN *et al.* 2019). A nova classificação é baseada no nível clínico de gravidade e divide a dengue em três categorias: 1) dengue sem sinais de alerta, 2) dengue com sinais de alerta e 3) dengue grave (Figura 7) (AJLAN *et al.* 2019). Essa nova classificação permitiu a detecção precoce de casos potencialmente mais graves e que necessitassem hospitalização (DEEN *et al.* 2006, AJLAN *et al.* 2019).

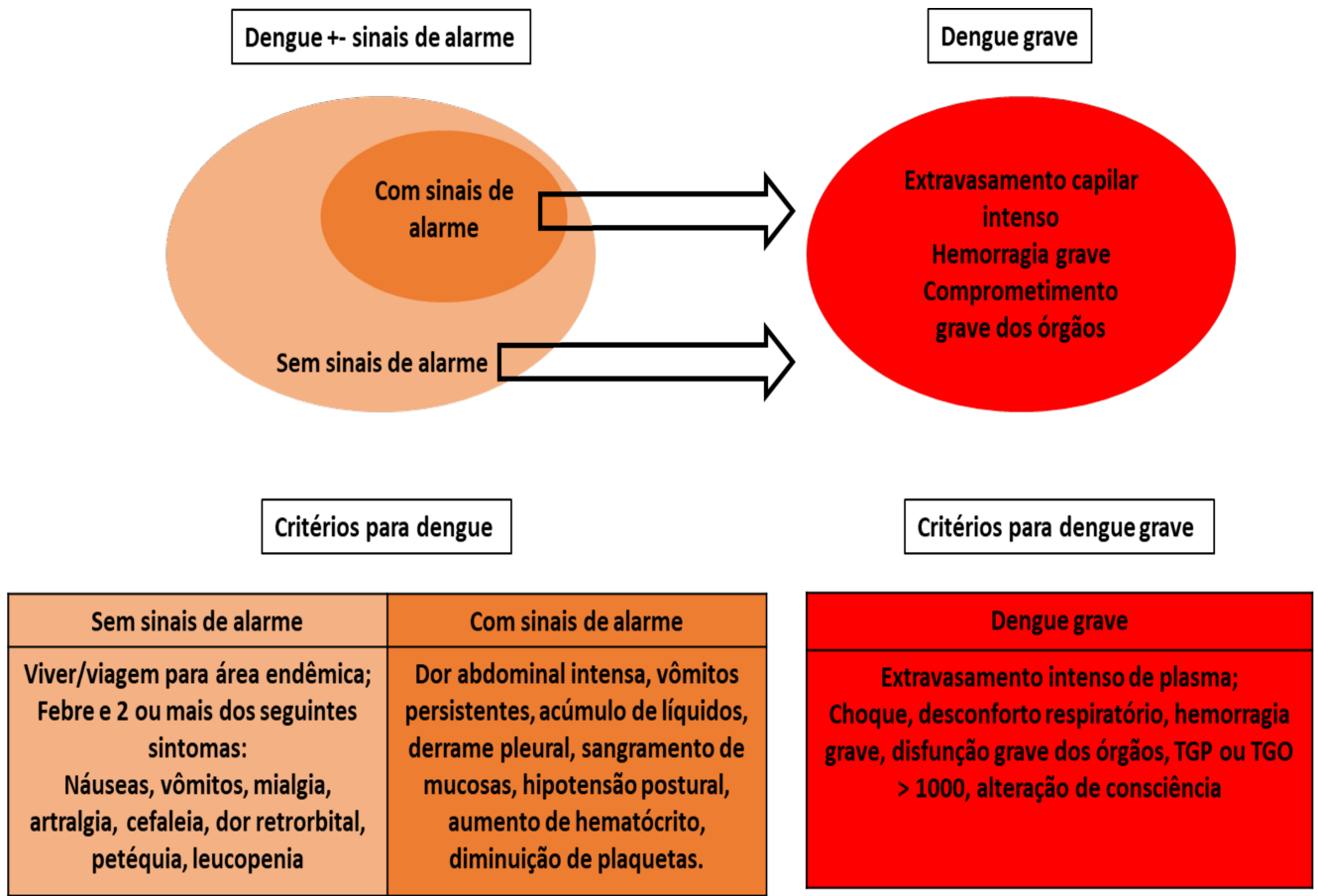


Figura 7: Classificação dos sinais clínicos de dengue.
Adaptado de *World Health Organization* (2009).

5.4 Patogênese

Após a picada do mosquito infectado na derme, o vírus se dissemina no hospedeiro, sendo detectado primeiramente nos linfonodos drenantes (FIGUEIREDO, 2009, ST. JOHN, ABRAHAM, GUBLER, 2013). No período de incubação, entre 4 e 7 dias após a picada, a viremia tem início, período que coincide com o início dos sinais e sintomas, como febre alta e repentina que atinge um platô por 1 ou 2 dias antes de ceder gradualmente. Neste estágio, ocorrem mudanças celulares no sistema hematopoiético, incluindo leucopenia, neutropenia, trombocitopenia (ST. JOHN, ABRAHAM, GUBLER, 2013). Na maioria dos casos, os sintomas regredem e os pacientes se recuperam, porém, em alguns casos os sintomas se agravam, dando início à fase crítica da doença, apresentando permeabilidade vascular, alterações importantes nos parâmetros hematológicos, e nos casos mais graves, comprometimento grave de órgãos, choque hipovolêmico e morte (DEEN *et al.* 2006). A ativação das células T e aumento de IgM e IgG, assim como o retorno dos parâmetros

hematológicos aos níveis normais, são indicativos da fase de recuperação da doença (Figura 6) (WHO, 2009, SIMMONS *et al.* 2015). A infecção primária pelo DENV resulta em imunidade permanente ao sorotipo infectante e ainda não foi documentada a reinfeção pelo mesmo sorotipo. No entanto, uma segunda infecção com sorotipo heterólogo pode causar um espectro mais amplo da doença (ST. JOHN, ABRAHAM, GUBLER, 2013).

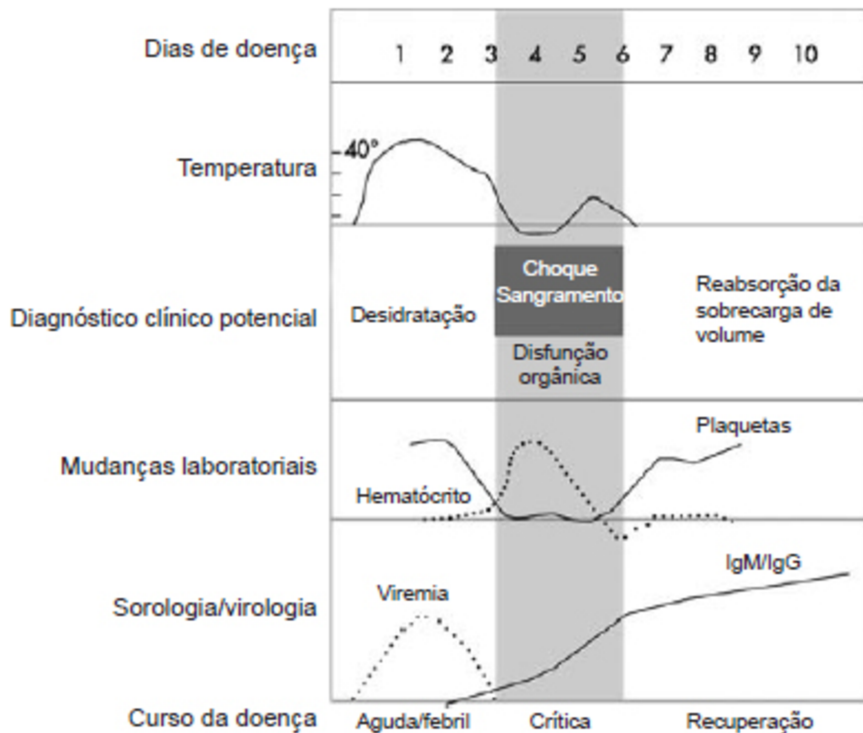


Figura 8: Fases da evolução da doença.

Fonte: Adaptado de *World Health Organization* (2009).

Na maioria dos casos, a infecção pelo DENV é minimamente sintomática, porém, numa pequena, mas relevante porcentagem (1-5% dos casos), esses indivíduos evoluem para as formas graves da dengue, onde podem desenvolver sinais e sintomas vasculares caracterizados por trombocitopenia, hemoconcentração, extravasamento plasmático intenso e choque hipovolêmico, o que pode ser fatal (BENTE *et al.*, 2005, JAISWAL *et al.*, 2009). Dessa forma, a única vacina licenciada para prevenção da dengue (Dengvaxia[®], Sanofi Pasteur) possui eficácia limitada e variada para os quatro sorotipos do vírus sendo não recomendada para amplo uso (WHO, 2009). Adicionalmente, a Agência Nacional de Saúde (Anvisa) publicou recentemente uma nota de esclarecimento desaconselhando o uso da Dengvaxia[®] em indivíduos soronegativos, ou seja, sem exposição prévia aos sorotipos de DENV (ANVISA, 2019). De

forma geral, o tratamento da infecção por dengue envolve apenas medidas paliativas como soroterapia e administração de analgésicos/antipiréticos, como o paracetamol (TAUIL, 2007).

A ausência de tratamento específico para prevenção da dengue, o ineficaz controle do mosquito vetor, somada ao incompleto conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na patogênese da doença, contribuem para manutenção dos casos sazonais e frequente recorrência das epidemias da doença. Segundo a WHO (2021), *“a principal forma de prevenção contra a dengue nos dias de hoje ainda é o combate aos mosquitos, eliminando os criadouros, estimulando a estruturação de políticas públicas efetivas para o saneamento básico, reforçar a participação da comunidade, aplicação de inseticidas apropriados”*.

De maneira importante, não há marcadores específicos que permitam classificar de forma efetiva os pacientes com maior risco de desenvolver as formas graves da doença, os quais poderiam se beneficiar do recurso da internação e de um suporte médico mais efetivo. Dessa forma, dentre os desafios oferecidos pela infecção pelo DENV se pode destacar: 1) a ausência de medidas eficazes de controle da propagação do mosquito vetor (TAUIL, 2007); 2) a ausência de terapia específica e eficaz contra a doença (LESCAR *et al.* 2018,TAUIL, 2002); 3) a baixa eficácia e contraindicações da única vacina licenciada em humanos para prevenção da doença (WHO, 2009); e, por fim, 4) a necessidade de melhor elucidação dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença que possam direcionar o desenvolvimento de terapias e biomarcadores para a mesma (COSTA *et al.* 2013).

Devido à grande relevância da doença e impacto causado no sistema de saúde, são necessários modelos adequados para o estudo da dengue. O tropismo do DENV por células humanas dificulta o estudo dos mecanismos de patogênese desse vírus e o teste de novos fármacos em animais imunocompetentes (MOTA; RICO-HESSE, 2009). Somado a isso, a falta de um modelo animal para estudo dessa doença, além da diversidade genética do vírus com 4 sorotipos diferentes, limita o entendimento da patogênese da dengue (COX *et al.* 2012).

6 JUSTIFICATIVA

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de drogas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças humanas de importância médica está na elevada taxa de falha (~40%) ou reduzida eficácia destes compostos durante os testes clínicos em fase II em seres humanos (LEGRAND *et al.* 2009, DRAKE *et al.* 2013). A ausência dessa eficácia sugere, pelo menos em parte, que os métodos de *screening* pré-clínico utilizados rotineiramente não mimetizam de maneira fidedigna os parâmetros clínicos da doença como vista em humanos. Estes estudos são geralmente baseados na utilização de sistemas de cultura *in vitro* (deficientes nas interações

fisiológicas) assim como em modelos experimentais que muitas vezes falham em mimetizar adequadamente a natureza dessas condições patológicas. O recente desenvolvimento da tecnologia dos modelos humanizados tem ajudado a reduzir estas falhas e minimizar tais fracassos (DRAKE *et al.* 2013, DRAKE *et al.* 2012).

A dengue é a principal arbovirose que acomete o homem na atualidade. No contexto da infecção pelo dengue, o tropismo por células de origem humana dificulta o estudo dos mecanismos de patogênese desse vírus e o teste de novos fármacos em modelos animais tradicionais (MOTA; RICO-HESSE, 2009). Ainda, a patogênese da infecção pelo DENV permanece sem completa elucidação e envolve uma complexa interação entre fatores virais, do vetor e do hospedeiro, além de um importante componente imunopatológico, os quais, dentro de um contexto social, ecológico e climático adequado, favorecem a ocorrência de quadros mais graves de doença (SHRESTA; HARRIS, 2008, FISCHL; BARTENSCHLAGER, 2011). Diante da ausência de tratamento específico e das limitações no uso de drogas licenciadas existentes, o aprofundamento nos estudos de elucidação da patogênese de tais doenças se torna necessário, a fim de se propor estratégias terapêuticas efetivas. Dessa forma, torna-se plausível propor a implementação de modelos de hu-camundongos a fim de permitir o avanço no estudo da patogênese e teste de possíveis terapias contra diversas doenças de importância médica cujo tropismo é exclusivo para células humanas, como é o caso da dengue.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo geral

Estabelecer um modelo humanizado em camundongos *Nod Scid Gamma – IL-2R γ ^{null}* (NSG) com potencial translacional para avaliação de novos alvos terapêuticos contra a dengue.

7.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar as potenciais fontes de células humanas para humanização de camundongos *Nod Scid Gamma – IL-2R γ ^{null}* (NSG):
 - A partir de fígado fetal humano;
 - A partir de bolsa de leucoaférese;
 - A partir de PBMC's humanos (*peripheral blood mononuclear cells* – células mononucleares do sangue periférico);

- ii. Caracterizar o perfil de reconstituição de leucócitos humanos após a inoculação de PBMC's no sangue e em outros órgãos;
- iii. Avaliar o desenvolvimento da infecção pelo dengue vírus no modelo humanizado com PBMC's humanos.

8 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as regulamentações éticas e de experimentos com animais do Governo Brasileiro (Lei 11794/2008). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA / UFMG, Protocolos de Autorização Números 246/2020 e 245/2020). A coleta de amostra humana foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Universidade Federal de Minas Gerais (Números de Protocolo 24832513.4.0000.5149 e 66128617.6.0000.5149). Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia com cetamina / xilazina e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais. Este estudo seguiu as diretrizes e preceitos éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa – COEP – desta Instituição no que se refere ao sigilo e privacidade das informações dos participantes, assim como respeitou os critérios e normas para utilização de animais de acordo com a legislação vigente e estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA.

8.1 Animais

Para o estabelecimento do modelo experimental, foram utilizados camundongos NSG machos e fêmeas, com idades entre 5 e 8 semanas, adquiridos no *THE JACKSON LABORATORY* (JAX) em Bar Harbor, Maine, USA. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG sob condições controladas de temperatura (28°C a 30°C), umidade (50%), ventilação, ciclos de iluminação claro e escuro (12h), com livre acesso a comida e água, em microisoladores, todos autoclavados. A manipulação dos animais foi realizada em fluxo laminar sob nível de Biossegurança 2. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFMG, sob protocolos 246/2020 e 245/2020

Ao final de cada um dos experimentos, as carcaças dos animais foram autoclavadas e em seguida acondicionadas em sacos plásticos brancos com simbologia infectante, destinadas ao armazenamento intermediário em freezer, recolhida pela equipe de limpeza do ICB e sua destinação foi feita de acordo com o regimento vigente no ICB.

8.2 Definição da taxa de humanização

A taxa de humanização dos animais foi o primeiro parâmetro a ser avaliado por citometria de fluxo. Para tanto, após a injeção com células progenitoras CD34⁺ provenientes de fígado fetal e bolsa de leucoaférese, assim como PBMC's, foi feita a coleta do sangue periférico dos animais por meio da punção da veia facial. Camundongos controle tiveram o sangue coletado da mesma forma. Foi considerado humanizado aquele animal que apresentou, no mínimo, 40% de reconstituição de células humanas após a inoculação das células humanas. A partir dos resultados deste experimento, foi definido o dia da infecção e a via de administração, os quais foram utilizados nos experimentos subsequentes.

8.3 Obtenção de células progenitoras CD34⁺ provenientes de fígado fetal humano.

Amostras de fígados fetais humanos foram obtidas em colaboração com a professora Paula Vidigal (patologista do Hospital das Clínicas/Belo Horizonte – HC/BH) sob assinatura de TCLE da família, e processadas como ilustrado na figura 8. As amostras eram de fetos natimortos ou óbitos neonatais e destinadas ao necrotério do HC/BH. Logo após o óbito, nossa equipe era informada e coletávamos o tecido *in natura*, mantido em solução salina e transportado em ambiente refrigerado até a UFMG, onde o material era imediatamente processado.

Dessa forma, oito fígados fetais foram obtidos a partir de fetos natimortos ou óbitos neonatais e com período gestacional variando entre 26 e 40 semanas (Tabela 3).

Tabela 3: Informações sobre as amostras de fígado fetal recebidos.

CÓDIGO	IDADE GESTACIONAL	SITUAÇÃO
FL 24055	36 semanas	Óbito neonatal
FL 24056	40 semanas	Natimorto
FL24057	37 semanas	Óbito neonatal
FL 24059	26 semanas	Natimorto
FL 24064	39 semanas	Óbito neonatal
FL 24066	40 semanas	Óbito neonatal
FL 24067	37 semanas	Natimorto
FL 24069	38 semanas	Óbito neonatal

As amostras dos fígados foram colocadas em placas de petri contendo colagenase dissolvida em RPMI 10% para a digestão do tecido e maceradas com o auxílio de tesoura ou

bisturi (Figura 9). O conteúdo foi transferido para um tubo cônico tipo falcon e deixado sob agitação a 37°C por 30 minutos a 200 rpm. Após o período de incubação, a suspensão celular foi filtrada em *cell strainer* com poros de 100µm, centrifugada a 400g por 8 minutos e o sobrenadante foi descartado. Após o descarte, o *pellet* foi ressuscitado em RPMI 10%. Após a ressuspensão do *pellet*, foi realizada a lise das hemácias por meio da incubação das amostras com ACK® *Lysing Buffer* (#A1049201 *Thermo Fisher Scientific*) por 10 minutos no gelo. Novamente as amostras foram centrifugadas a 400g por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram contadas em câmara de *Neubauer* na diluição 1:100. Em seguida, as células progenitoras foram isoladas por seleção positiva (remoção das células de interesse) utilizando o kit de seleção positiva *EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit II* (#17856 *Stem Cell Technologies*), conforme instruções do fabricante. Para tanto, a concentração foi ajustada para 2×10^8 células/mL em meio RPMI completo. Em seguida, o coquetel de seleção positiva (100µL por mililitro de célula) foi adicionado à suspensão celular, seguido de gentil homogeneização e incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. As nanopartículas magnéticas foram homogeneizadas para garantir uma suspensão uniforme e adicionadas à suspensão celular na proporção de 50µL de nanopartículas magnéticas por mililitro de suspensão celular. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Foi adicionado PBS 1x e as células homogeneizadas delicadamente com pipeta. O tubo foi inserido na coluna de magneto e incubado por 5 minutos. O magneto foi vertido, descartando o sobrenadante da coluna. O processo de lavagem foi repetido mais duas vezes. O *pellet* foi ressuscitado e as células contadas em câmara de *Neubauer*, usando diluição 1:10 (5µL de amostra + 45µL de Turk). Em seguida, as células foram avaliadas por citometria de fluxo para avaliação da pureza (frequência de células CD34 positivas) e viabilidade celular.

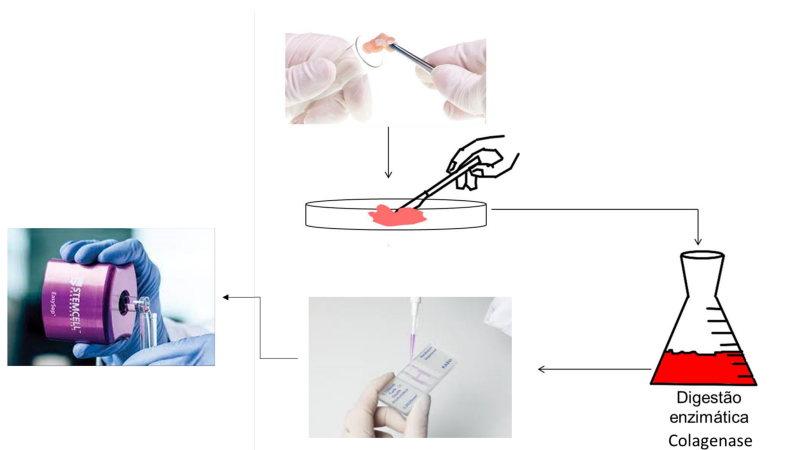


Figura 9: Esquema ilustrativo para obtenção de células progenitoras CD34+ provenientes de fígado fetal humano por beads magnéticas.

8.4 Obtenção de células progenitoras CD34⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese.

Bolsas de leucoaférese enriquecidas em células progenitoras foram gentilmente cedidas pela professora Jordana Reis do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, em parceria com a FIOCRUZ. sob registro RMS13042010/01.

As bolsas de leucoaférese utilizadas neste trabalho foram obtidas de doadores saudáveis e tratados com o fator de crescimento hematopoiético GM-CSF para mobilização das células progenitoras do sangue periférico.

Sabendo que a bolsa de leucoaférese é bastante concentrada em células, e para se evitar formação de grumos celulares, 50 mL da suspensão celular foi inicialmente diluída em 1 litro de PBS 1x. Em seguida, as células mononucleares foram concentradas em solução de separação por gradiente de densidade (Ficoll® Paque Plus, densidade de 1.077 g/mL). Em seguida, as células progenitoras provenientes da bolsa de leucoaférese foram purificadas por seleção positiva utilizando kit de seleção positiva *EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit II* (#17856 *Stem Cell Technologies*), conforme recomendações do fabricante e descrição acima.

Para fins comparativos, células diretamente da bolsa de leucoaférese foram concentradas por gradiente de densidade (Ficoll® Paque Plus, densidade de 1.077 g/mL) e células purificadas por *beads* magnéticas foram avaliadas por citometria de fluxo para determinação da frequência de células CD34⁺ viáveis.

8.5 Obtenção de células mononucleares a partir do sangue periférico – PBMC – provenientes de doadores saudáveis.

Para esse modelo, sob protocolo de ética CAAE: 30492014.9.0000.5091 e sob assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sangue periférico foi coletado de 5 doadores saudáveis, sem uso de medicamentos, e negativos para algum tipo de doença inflamatória e negativos para IgG para o dengue vírus (Tabela 4) em 3 tubos heparinizados de 9 mL, e a separação dos PBMC's foi feita através da diferença de gradiente em Ficoll® Paque Plus. Dentro do fluxo laminar, os tubos de coleta foram abertos e o sangue total foi transferido para novos tubos cônicos, tipo falcon, contendo 4mL de Ficoll® Paque Plus. Os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm/30 min/25°C. Após a centrifugação, a interface contendo as células foi coletada (Figura 10) e lavada 2X com a solução de PBS 1x e novamente centrifugado a 2.000 rpm/10 min/4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 5 mL de DMEM e as células foram contadas na câmara de *Neubauer*.

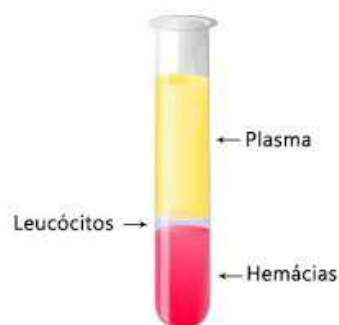


Figura 10: Foto ilustrativa da "nuvem" de leucócitos formada após a separação por gradiente de ficoll.

8.6 Determinação dos níveis de anticorpos específicos IgG – anti-dengue dos doadores de PBMC's pelo ensaio de ELISA.

A quantificação de anticorpos no soro dos doadores de PBMC foi realizada através do kit PANBIO® Dengue IgG *Indirect* ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante. O resultado está descrito na tabela 4.

Tabela 4: Resultado de IgG-dengue por doador.

DOADORES	RESULTADO	VALORES DE REFERÊNCIA
DOADOR 1	1,86	Negativo: < 9
DOADOR 2	10,71	<i>Bordeline:</i> entre 9 e 11
DOADOR 3	22,32	Positivo: > 11
DOADOR 4	19,61	
DOADOR 5	0,38	
DOADOR 6	0,73	
DOADOR 7	1,69	
DOADOR 8	0,69	

8.7 Propagação e concentração do Dengue vírus.

Para este estudo, foi utilizada a linhagem *Dengue virus* – DENV-2 – 3295: Genbank EU081177.1, gentilmente cedida pelo Prof. Eng Eong Ooi, da *DUKE MEDICAL SCHOOL OF SINGAPORE – DUKE NUS*.

O DENV-2 foi propagado em células C6/36 (*Aedes albopictus* clone C6/36) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) sob número 0343, mantidas em estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), com atmosfera umidificada a

37°C na presença de meio de cultivo *Leibowitz* L-15 suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 10% Soro Fetal Bovino – por 5-7 dias.

Os sobrenadantes obtidos das culturas infectadas foram centrifugados a 600g por 10 minutos para retirada dos fragmentos celulares. Subsequentemente, o sobrenadante foi adicionado na coluna de concentração viral (*Vivacell 100 centrifugal concentrator – Sartorius, Alemanha*) e as partículas virais foram concentradas pelo auxílio de centrifugação (2000g por 10 min). O volume que ultrapassou a membrana foi descartado e o sobrenadante que permaneceu no concentrador foi aliquotado e armazenado em freezer -80°C para uso posterior. O título viral das amostras foi obtido através do ensaio de formação de placas expresso em PFU (*Plaque Formation Assay – unidade formadora de placa*), em células permissivas da linhagem VERO CCL81, como descrito abaixo.

8.8 Determinação da carga viral por ensaio de titulação viral.

Para determinar a carga viral nas amostras de soro e tecidos (fígado e baço) dos camundongos infectados pelo DENV, foi empregada a técnica de titulação viral por ensaio de formação de placas de lise como descrito por Baer; Kehn-Hall (2014).

Brevemente, células da linhagem VERO CCL81 (derivadas do rim de macaco verde africano – *Cercopithecus aethiops* e provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) sob número 0245) foram tripsinizadas, homogeneizadas e semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 5×10^5 células/poço. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por cerca de 24 horas, quando seus poços apresentaram uma monocamada de células com uma confluência de 80-85%. As amostras de baço e fígado foram, então, pesadas, maceradas com cadinho e pistilo de porcelana estéreis e diluídas seriadamente em meio RPMI com antibióticos na ausência de SFB. As amostras de soro foram diretamente diluídas em meio RPMI. A cada poço de uma placa foi adicionado 300 µL de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-4}) de uma dada amostra de tecido, ou diluições de (10^{-2} a 10^{-6}) para o soro. O controle de células foi um poço não inoculado, ao qual foi acrescentado apenas 300 µL do meio RPMI com antibióticos na ausência de SFB ou 300 µL do soro dos animais controles não infectados. As placas foram incubadas por um período de uma hora a 37°C (período de adsorção viral) durante o qual foram gentilmente movimentadas de quinze em quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Terminado o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com meio RPMI. Em seguida, foi adicionado meio RPMI contendo 0.8% de CMC

(carboximetilcelulose), antibióticos e 2% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C por 5 dias, período no qual os efeitos citopáticos podem ser observados ao microscópio invertido. Após 5 dias, as células foram fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em água deionizada, para a determinação do título viral das amostras, os quais foram expressos em PFU/g ou PFU/mL.

8.9 Infecção dos camundongos

A via de infecção utilizada foi intravenosa. Os animais humanizados e não humanizados foram divididos em grupos a serem infectados com DENV-2 e seus controles não infectados. Os camundongos infectados receberam 200µL do inóculo do vírus contendo 1×10^6 PFU. Todo procedimento de infecção foi realizado no fluxo laminar e todos os animais foram monitorados após a infecção.

8.10 Citometria de fluxo para quantificação viral da proteína NS3 do vírus.

Para determinar a presença da proteína viral nas amostras de soro e baço dos camundongos infectados pelo DENV, foi empregada a técnica de citometria de fluxo. Brevemente, 300µL de sangue dos animais foi transferido para um tubo tipo falcon e adicionado 9mL de água *Milli Q* gelada para lise das hemácias, incubado por 30 segundos e adicionado 1mL de PBS 1X para corrigir a isotonia da solução. Em seguida, os falcons foram centrifugados a 1.400 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado com 200µL de FACS *buffer* e as células transferidas para uma placa de 96 poços de fundo U. As placas foram centrifugadas a 1.200 rpm, por 5 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, as placas foram flicadas para desprezar o sobrenadante, adicionado 20µL dos anticorpos de superfície – hCD45 PeCy7 e mCD45 Fitc – e incubado por 30 minutos no gelo. Após esse período, foi adicionado 100µL de PBS/BSA1% em cada poço e a placa e centrifugada a 1.200 rpm por 5 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, a placa foi flicada, e adicionado PFA 1% pH 7.4 para fixar as células. As células foram incubadas no gelo por 20 minutos, centrifugadas a 1.200 rpm, por 5 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, a placa foi flicada, adicionado 200µL de FACS *buffer* por poço e mantida na geladeira até o dia seguinte. No dia seguinte, a placa foi centrifugada a 1.200 rpm, por 5 minutos, a 4°C, flicada, adicionado 100µL de *permbuffer* diluído a 1:10 em água de injeção e incubado por 15 minutos no gelo. A placa foi centrifugada, flicada para eliminar o *permbuffer*, o *pellet* ressuscitado em solução de anticorpo intracelular contendo NS3 (NS3 1:60 em 40µL de *permbuffer* e incubada por 20

minutos no gelo. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 1.200 rpm, por 5 minutos, a 4°C, flicada. Essa etapa de lavagem foi repetida. O *pellet* foi ressuspenso em solução de anticorpo intracelular contendo anti-*rabbit* APC 1:200 em 40µL e a placa centrifugada a 1.200 rpm, por 5 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, a placa foi flicada e a etapa de lavagem repetida. Após a lavagem, foi adicionado 200µL de FACS *buffer* por poço e transferido para tubos de vidro para leitura no citômetro. O procedimento para marcação de baço foi feito da mesma maneira, plaqueando 1 a 2 milhões de células por poço.

8.11 Acompanhamento de peso e letalidade

Todos os animais foram pesados e acompanhados durante todos os experimentos para a observação da variação de peso e letalidade. Animais que atingiram 85% do seu peso corporal inicial foram eutanasiados de acordo com as regras do comitê de ética animal (Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal, 2016).

8.12 Análise hematológica

Após a anestesia com uma solução de 80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina, amostras de sangue foram obtidas diretamente através da punção da veia cava inferior dos animais com o uso de uma agulha de 20G e seringa de 3mL heparinizadas e posteriormente separadas para contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas, hematócrito e coleta do soro para titulação da carga viral e determinação dos níveis de citocinas humanas e murinas pela técnica de ELISA. Para contagem total, amostras de sangue foram diluídas em solução de *Turk* a uma proporção de 1:40, contadas em câmara de *Neubauer* e o resultado foi expresso em número total de leucócitos por mililitro de sangue. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em lâminas contendo esfregaço sanguíneo, coradas com Kit Panótico, e o resultado expresso como frequência de cada tipo celular. Para a contagem de plaquetas, parte do sangue coletado foi diluído na proporção de 1:100 em solução de oxalato de amônio 1% p/v e deixado em repouso em câmara de *Neubauer* por no mínimo 15 min. Após a deposição das plaquetas, a contagem foi feita ao microscópio e o resultado expresso em número total de plaquetas/µL de sangue. Foi utilizado o microscópio *Nikon XP-1000* para todos os procedimentos de contagem de leucócitos e plaquetas. A mensuração do índice de hematócrito foi realizada utilizando capilares heparinizados (*Perfecta*) para microhematócrito. Capilares contendo sangue foram centrifugados em centrífuga apropriada (*Centrifuge hematocrit HT*) por 10 min e o resultado expresso em porcentagem referente à fração celular do sangue: Fração

vermelha (concentração de elementos do sangue) e branca (concentração de plasma), através de uma regra de três simples:

$$\text{Fração branca} + \text{vermelha} = 100\%$$

$$\text{Fração vermelha} = X$$

Por fim, o restante de sangue de cada amostra foi centrifugado para separação e coleta de soro (1200g por 10 minutos). Posteriormente, o soro foi dividido em dois tubos, sendo um para quantificação da carga viral (armazenado a -80°C) e o segundo para demais análises (armazenado a -20°C).

8.13 Análise histopatológica

Para a análise histopatológica, ao final do experimento (5 dias após infecção), todos os camundongos foram eutanasiados e amostras do fígado foram coletadas. As amostras foram, então, imediatamente fixadas em 10% de formalina tamponada durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas em água para retirada do excesso de formol e mantidas no álcool 70% por mais 24 horas. Em seguida, as amostras passaram por um processo de desidratação, diafanização e banhos de parafina, para então serem incluídas em parafina, cortadas, montadas em lâminas, coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Para o processo de coloração, as lâminas histológicas foram desparafinizadas em xilol (3 vezes de xilol I - 30 minutos, xilol II - 10 minutos e xilol III- 5 minutos). Na sequência, os tecidos foram hidratados em soluções de etanol em concentrações decrescentes (100%, 90%, 80%, 70% e 50%) e foi finalizada com banho em água deionizada por 5 minutos. O material seguiu para a recuperação antigênica em solução de tampão citrato 0,1 M (300 mL) no banho maria a 96° por 20 min. As lâminas permaneceram no tampão citrato por mais 20 minutos para resfriamento e, ao término, 5 banhos em água deionizada foram realizados. Procedeu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 a 10% v/v em metanol por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 5 minutos). Na continuação, realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas com BSA 2% p/v e Tween 20 0,1% v/v por 1 hora em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram desincubadas e lavadas com pisseta para tirar o restante do anticorpo. As lâminas foram lavadas 3 vezes em solução de PBS 1X. Após a lavagem, seguiu-se com a amplificação do sinal utilizando a estreptavidina-biotina-peroxidase do kit *Advanced (Dako)* durante 1 hora em câmara úmida. Os cortes foram lavados com PBS puro e passaram por lavagem em soluções de PBS (3 vezes de 5 minutos). Procedeu-se, então, com a revelação, ou seja, o material foi colocado em uma solução contendo o cromógeno DAB 0,025% v/v em PBS e H_2O_2 . Essa etapa foi finalizada em água corrente por 5 minutos. Foi realizada a contra-coloração com

hematoxilina de Harris (6 segundos), lavagem em água corrente por 5 minutos e hidratação em concentrações crescentes de etanol (70%, 90%, 2 vezes de 100% - as duas primeiras soluções por 5 minutos cada e, quando em etanol absoluto, 10 minutos para cada banho). O material seguiu para diafanização (2 vezes de xilol I - 15 minutos e xilol II - 10 minutos). Ao fim foi feita montagem das lâminas com *Entellan*.

Após esse processo, as amostras foram avaliadas sob um microscópio *Axioskop 40* (*Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha*) adaptado a uma câmera digital (*PowerShot A620, Canon, Tóquio, Japão*). A pontuação histopatológica foi realizada individualmente para cada amostra a partir da avaliação de diversos parâmetros específicos. Foram avaliados os seguintes parâmetros nos cortes corados por H&E: infiltrado inflamatório, edema dos hepatócitos, degeneração, necrose, hemorragia (0: ausente; 1: mínimo; 2: leve; 3: moderado; 4: acentuado; 5: grave). Após a análise, as pontuações foram somadas, podendo totalizar 25 pontos (Tabela 6).

Tabela 5: Parâmetros de escore histopatológico.

GRAU DA LESÃO	PONTUAÇÃO
AUSENTE	0 a 1
MÍNIMO	2 a 6
MODERADO	7 a 12
INTENSO	13 a 18
SEVERO	19 a 25

8.14 Análise histoquímica para hCD45

Para a análise histoquímica, as amostras de tecido coletadas foram fixadas em 10% de formalina tamponada durante 24 horas, processadas, incluídas em parafina, cortadas, montadas em lâminas e deixadas para secar. Após a secagem, as lâminas foram processadas, conforme descrito no item 8.13. Primeiramente, as lâminas histológicas foram desparafinizadas em xilol (3 vezes de xilol I - 30 minutos, xilol II - 10 minutos e xilol III- 5 minutos). Na sequência, os tecidos foram hidratados em soluções de etanol em concentrações decrescentes (100%, 90%, 80%, 70% e 50%) e foi finalizada com banho em água deionizada por 5 minutos. O material seguiu para a recuperação antigênica em solução de tampão citrato 0,1 M (300 mL) no banho maria a 96° por 20 min. As lâminas permaneceram no tampão citrato por mais 20 minutos para resfriamento e, ao término, 5 banhos em água deionizada foram realizados. Procedeu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 10% v/v em metanol por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 5 minutos). Na continuação, realizou-se o bloqueio de

ligações inespecíficas com BSA 2% p/v e *Tween 20* 0,1% v/v por 1 hora em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram desincubadas e lavadas com pisseta para tirar o restante do anticorpo. A marcação das células humanas foi feita com o anticorpo anti-hCD45 (*Biolegend*), por meio do kit *Mouse on Mouse Polymer IHC* (ab269452), de acordo com instruções do fabricante.

8.15 Citometria de fluxo para avaliação de células CD34⁺ provenientes de fígado fetal e células de bolsa de leucoaférese.

A pureza e viabilidade das células progenitoras purificadas a partir de fígados fetais e bolsas de leucoaférese foi determinada pela técnica de citometria de fluxo. As amostras recebidas foram processadas como descrito nos itens 8.3 e 8.4.

Quinhentas mil células foram plaqueadas em placas de poços de fundo em U e centrifugadas para eliminação do sobrenadante. O *pellet* celular foi incubado com o marcador de viabilidade *eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506* – 650866, um corante que distingue células vivas de células mortas com base na integridade da membrana celular, permitindo a exclusão de células mortas na leitura da citometria de fluxo, por trinta minutos no gelo e protegido da luz. O *pellet* celular foi lavado duas vezes com solução PBS/FBS 1%. Em seguida, as células foram incubadas com anti-hCD45 (FITC, *Biolegend*, diluição 1:100) e anti-hCD34 (PE, *Biolegend*, diluição 1:100) diluídos em solução PBS/FBS 1%. A incubação ocorreu por 30 minutos no gelo e protegido da luz. Após o período de incubação, 100µL de PBS/FBS 1% foi adicionado a cada poço, a placa foi centrifugada para eliminação do sobrenadante e as células foram ressuspensas em 200µL de PBS/FBS 1%. Após a marcação, as amostras foram lidas no citômetro *FACS Canto™ II* (BD *Bioscience*). Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra e a estratégia de *gate* utilizada para os marcadores acima descritos. A análise das leituras foi realizada no *Software FlowJo™* (*Tree Star*).

8.16 Citometria de fluxo para avaliação de células CD45⁺ e subpopulações no sangue, baço e fígado.

Os animais foram eutanasiados ao final de cada experimento e o sangue, baço e fígado foram coletados para marcação de superfície com anticorpos anti-hCD45 (FITC, *Biolegend*, diluição 1:100), anti-mCD45 (PeCy7, *Biolegend*, diluição 1:100), anti-hCD3 (PE, *Biolegend*, diluição 1:300), anti-hCD4 (BV510, *Biolegend*, diluição 1:20), anti-hCD8 (PE, *Biolegend*, diluição 1:100), anti-hCD19 (PE, *Biolegend*, diluição 1:100), anti-hCD14 (PeCy7, *Biolegend*, diluição 1:100). Após a marcação, as amostras foram lidas no citômetro *FACS Canto™ II*

(BD *Bioscience*). Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra. A análise das leituras foi realizada no software *FlowJo™* (*Tree Star*)

Tabela 6: Anticorpos utilizados nas marcações.

ANTICORPO	FLUORÓFORO	ALVO	CLONE	FABRICANTE
CD45	Fitc	Humano	HI30	<i>Biologend</i>
CD45	PeCY7	Camundongo	A20	<i>Biologend</i>
CD3	PE	Humano	HIT3a	<i>Biologend</i>
CD4	BV510	Humano	OKT4	<i>Biologend</i>
CD8	PE	Humano	HIT8a	<i>Biologend</i>
CD19	PE	Humano	HIB19	<i>Biologend</i>
CD14	PeCY7	Humano	HCD14	<i>Biologend</i>
CD11c	BV421	Humano	3.9	<i>Biologend</i>
CD34	PE	Humano	581	<i>Biologend</i>
NS3		Coelho	#GTX124252	<i>GeneTex</i>

8.17 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão médio (EPM) por grupo de 7 camundongos (linhagem NSG), assim como definido no cálculo amostral aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t não paramétrico (*MAN-WHITNEY*) ou a análise de variância a um critério (*ANOVA ONE-WAY*), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Para a realização de todas as análises estatísticas utilizou-se o *software GraphPad PRISM 7* (*GraphPad Software, EUA*). Os níveis de significância foram estabelecidos em $p < 0,05$.

9 RESULTADOS

9.1 As células progenitoras humanas CD34⁺ purificadas a partir de fígado fetal humano apresentaram baixa viabilidade, inviabilizando seu uso para geração de animais humanizados.

O fígado fetal é um órgão rico em células progenitoras, sendo uma das principais fontes de células CD34⁺ utilizadas para reconstituição de um sistema hemato-linfóide humano quando transplantado em camundongos imunocomprometidos (BILLERBECK *et al.* 2016). Assim, nosso primeiro objetivo específico visamos a obtenção de células CD34⁺ provenientes de fígado

fetal humano para humanização de camundongos NSG. Nossas amostras foram obtidas no Hospital das Clínicas de Belo Horizonte, conforme descrito em Materiais e Métodos e constavam de 5 fígados provenientes de fetos com óbito neonatal e 3 amostras provenientes de fetos natimortos, como consta na tabela 3. A fim de avaliarmos a qualidade das células progenitoras purificadas a partir dos fígados fetais, inicialmente determinamos a viabilidade e pureza da suspensão celular pela técnica de citometria de fluxo. A figura 11A representa a estratégia de *gate* empregada, bem como o resultado de uma amostra representativa. Para avaliação da pureza, as células CD45⁻CD34⁺ foram identificadas (Fig. 11A, segundo painel) e a pureza encontrada foi de 66,8%. Em seguida verificamos a frequência de células negativas e positivas para o marcador de viabilidade (Fig. 11A, terceiro painel). Nossa análise demonstrou que, apesar dos fígados fetais serem de fato uma boa fonte de células progenitoras, apenas 6,51±2.5% das células CD45⁻CD34⁺ se apresentavam viáveis ao final do processo de purificação (Fig. 11B). O reagente utilizado neste estudo para a determinação da viabilidade celular é um corante fluorescente que reage com aminas, não é permeável às células vivas, mas permeável às células com membranas comprometidas. Conforme pode ser visto na estratégia de *gate* representativa (Fig. 11A), a grande maioria das células progenitoras purificadas apresentaram marcação positiva para o marcador de viabilidade indicando que a suspensão celular era predominantemente formada de células mortas. A baixa viabilidade foi confirmada pelo teste de viabilidade usando azul de tripan e câmera de *Neubauer*. Para que a amostra seja considerada adequada para enxertia, ela deve apresentar um mínimo de 90% de viabilidade (BILLERBECK *et al.* 2016, DUAN *et al.* 2011). Neste estudo, a viabilidade das células progenitoras foi de, no máximo, 22,6% (Figura 11B), um valor significativamente inferior em relação ao critério de viabilidade mínima estabelecido na literatura. Dessa forma, o uso de fígados fetais provenientes do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte para geração de um modelo humanizado, não se demonstrou viável e a baixa viabilidade das células progenitoras purificadas impossibilitou o prosseguimento da humanização. Por essa razão, outras fontes de células humanas para a humanização de animais NSG foram investigadas.

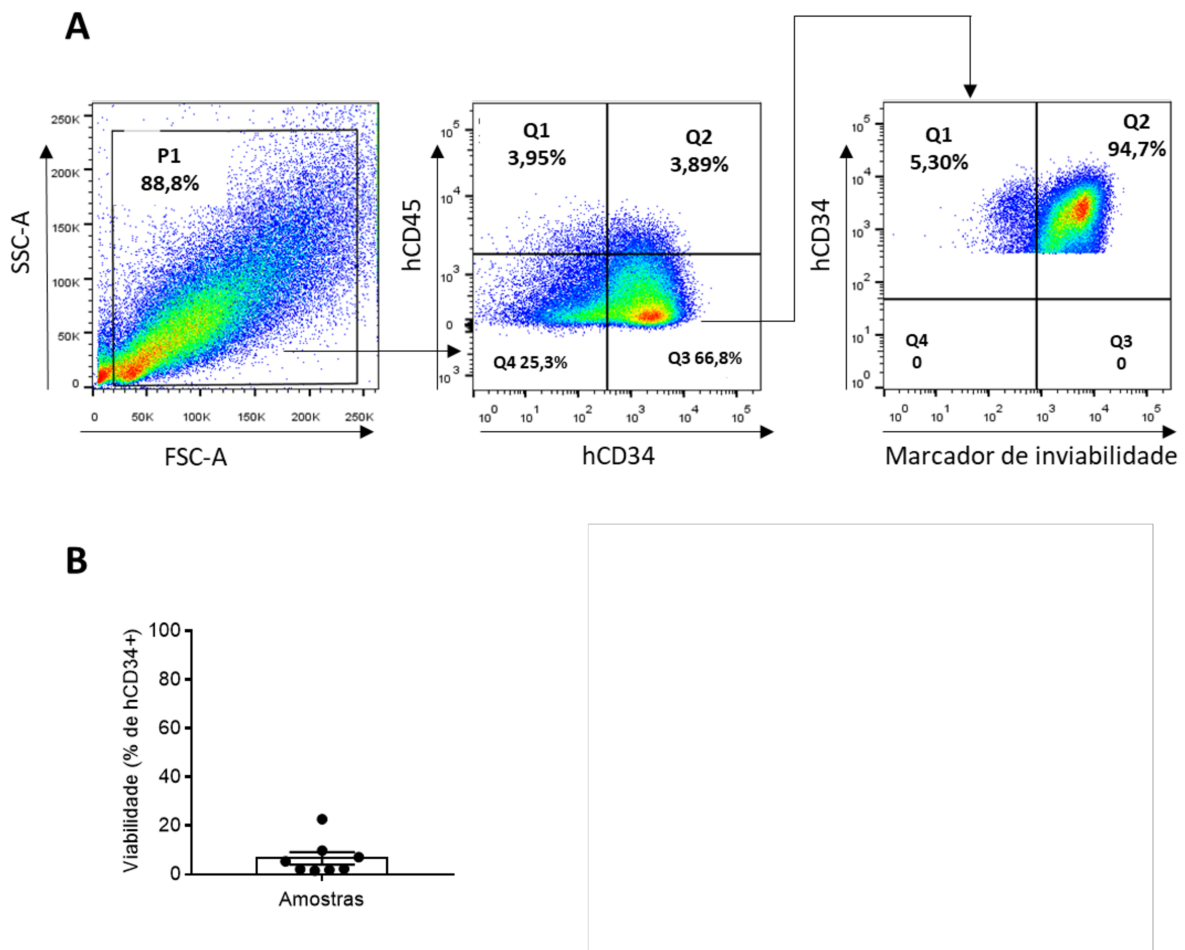


Figura 11: Células progenitoras CD34⁺ viáveis obtidas a partir de amostras de fígado fetal humano.

Amostras de fígado fetal humanos (tabela 3) foram processadas por dissociação e digestão, e as células CD34⁺ individualizadas foram purificadas por seleção positiva. Em seguida, a pureza e viabilidade das células-tronco hematopoiéticas foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. (A) Estratégia de *gate* para definição da população de células humanas CD34⁺ viáveis demonstrada por *dot plots*. *Dot plot* representativo de uma dentre oito amostras de fígado fetal humanos purificadas. (B) Gráfico representativo da viabilidade das células CD34⁺ purificadas a partir de fígado fetal. Viabilidade celular expressa como frequência (%) de células viáveis dentro da população de células CD34⁺. Coluna representa a média e barra de erro representa o erro padrão da média (EPM).

9.2 As células progenitoras humanas CD34⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese apresentaram bom rendimento e viabilidade, mas falharam em induzir humanização nas condições testadas.

Para fins comparativos, a frequência de células progenitoras viáveis passou por três análises e foi determinada antes do processo de purificação (Fig. 12B, segundo painel), após a concentração das células mononucleares em Ficoll® Paque Plus (Fig. 12B, terceiro painel) e após a purificação dos PBMC's por *beads* magnéticas (Fig. 12B, quarto painel). Nossa análise demonstrou que as bolsas de leucoaréfereze utilizadas eram enriquecidas em células

progenitoras, apresentando frequência de hCD34⁺ acima de 1% (Fig. 12B, segundo painel). Nossos dados também demonstraram que a etapa de concentração em Ficoll® Paque Plus resultou em uma suspensão de células mononucleares rica em células CD34⁺ (13.7% de células hCD34⁺) (Fig. 12B, terceiro painel), a qual foi utilizada para purificação por *beads* magnéticas. Finalmente, a seleção positiva por *beads* magnéticas gerou uma suspensão celular contendo 79,7% de células hCD45^{dim}hCD34⁺ viáveis em quantidades adequadas para a enxertia dos camundongos NSG (Fig. 12B, quarto painel). A figura 12A demonstra a estratégia de *gate* para determinar a frequência de células hCD45^{dim}hCD34⁺ viáveis na amostra purificada por *beads* magnéticas. A análise dos dados citometria de fluxo indicou que a viabilidade das células progenitoras encontravam-se acima de 90% após o processo de purificação (Fig. 12A, terceiro painel). Dessa forma, o uso de bolsas de leucocaférese enriquecidas com GM-CSF para a geração de um modelo humanizado se demonstrou viável e o bom rendimento e viabilidade das células progenitoras purificadas possibilitou o prosseguimento da enxertia em camundongos NSG.

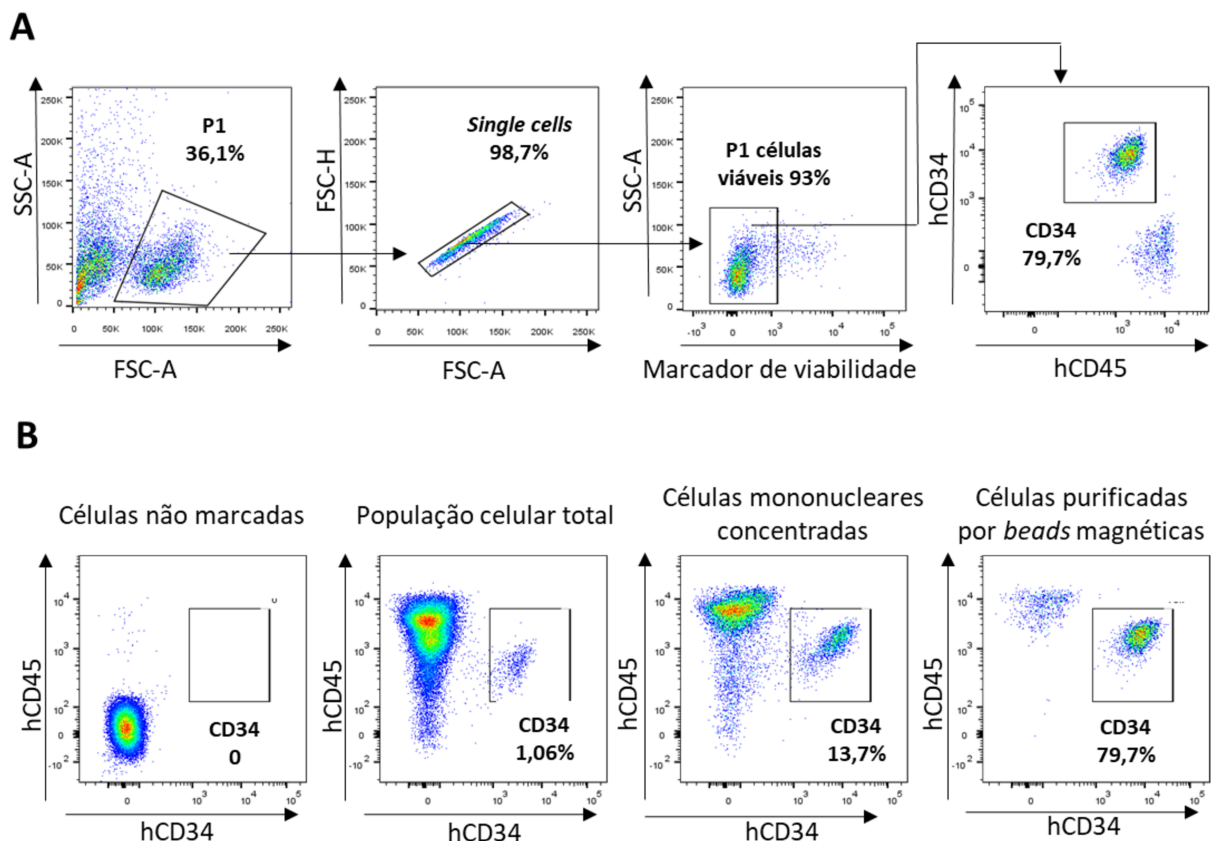


Figura 12: Isolamento e viabilidade após processamento das células CD34⁺ provenientes de bolsa de leucocaférese de pacientes adultos.

As células da bolsa de leucoaférese foram concentradas por centrifugação em gradiente de densidade (Ficoll®) seguido por seleção positiva de células tronco hematopoiéticas (CD34⁺) utilizando *beads* magnéticas. A pureza e viabilidade das células-tronco hematopoiéticas foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. (A) Estratégia de *gate* para definição da população de células humanas CD34⁺ viáveis demonstrada por *dot plots*. (B) *Dot plots* representativos das seguintes populações celulares provenientes da bolsa de leucoaférese: células não marcadas com anticorpos (controle não marcado); população celular total (antes dos processos de concentração e purificação); células mononucleares concentradas por centrifugação em gradiente de densidade; células-tronco hematopoiéticas purificadas por centrifugação em gradiente de densidade seguida por seleção positiva de células CD34⁺ utilizando *beads* magnéticas.

9.3 Avaliação da reconstituição de células CD34⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese em camundongos NSG.

Após a avaliação da frequência de células progenitoras CD34⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese descrita no item 8.4, avaliamos o potencial de reconstituição dos camundongos NSG. Para tanto, camundongos NSG jovens, de 5 semanas, foram inoculados com 10⁶ células isoladas por *beads* e acompanhamos ao longo de 12 semanas a reconstituição das células, semanalmente por citometria de fluxo. Para análise da frequência de leucócitos humanos pela técnica de citometria de fluxo, escolhemos o marcador de superfície CD45, por ser uma molécula comumente expressa nos diversos subtipos de leucócitos humanos. Durante o período, os animais receberam 3 estímulos com GM-CSF, nos dias 1, 42 e 53, respectivamente (Fig. 13A). Nossos resultados indicam que, nas condições testadas e nos períodos avaliados, não obtivemos reconstituição de hCD45⁺ (Fig. 13B). A Figura 13B representa a estratégia de *gate* utilizada para avaliação da taxa de humanização dos animais que receberam as células progenitoras, como resultado representativo de 10 animais. Como não identificamos nenhum sinal de humanização, decidimos não representar graficamente.

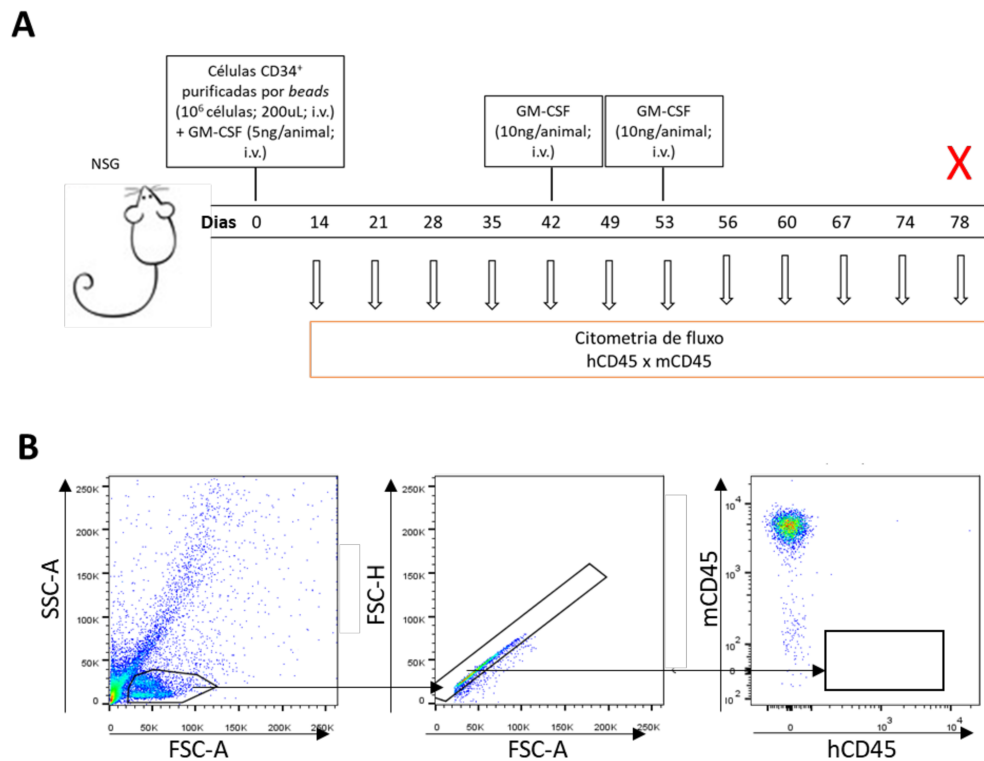


Figura 13: Avaliação do potencial de reconstituição de camundongos NSG a partir de células-tronco hematopoiéticas CD34⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese.

Após o isolamento das células CD34⁺, animais NSG foram inoculados com 10⁶ células-tronco progenitoras por via intravenosa. (A) Esquema experimental da inoculação das células CD34⁺ e imunofenotipagem ao longo do tempo para a determinação da frequência de leucócitos humanos no sangue periférico dos animais. Durante o período foram feitos três estímulos com GM-CSF (5ng/animal administrados por via intravenosa no dia 0 e 10ng/animal nos dias 42 e 53). (B) Representação da fenotipagem de células mCD45 *versus* hCD45 no sangue periférico de camundongos NSG 78 dias após a injeção de células CD34⁺.

9.4 Estratégia de humanização e caracterização do perfil celular no sangue periférico de camundongos NSG a partir da injeção de PBMC's humanos provenientes de doadores saudáveis.

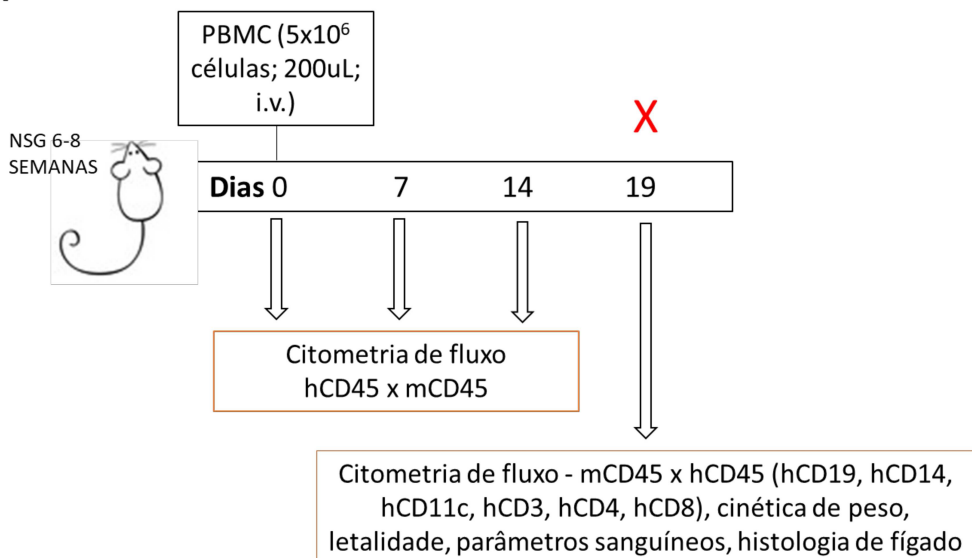
Visto que não obtivemos sucesso com a tentativa de humanização com células progenitoras CD34⁺ provenientes de fígado fetal humano, bem como com a tentativa de humanização com células progenitoras CD34⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese, decidimos tentar outra fonte de células humanas.

Sabendo que o PBMC é uma fonte de células disponível, de fácil obtenção e que promove uma boa taxa de humanização (BREHM *et al.* 2010, AKKINA, 2013), nós optamos por uma nova tentativa de humanização a partir dessas células. Obtivemos as amostras de sangue de pacientes saudáveis e sem prévia exposição ao vírus da dengue. Para isso, avaliamos o sangue desses doadores, investigando a presença de IgG-anti-dengue nas amostras (Tabela

4). Somente as amostras dos doadores que apresentaram resultado negativo foram utilizadas no experimento.

Para isso, camundongos NSG foram inoculados i.v. com 5×10^6 células de PBMC's (hCD45) de diferentes doadores e a taxa de humanização foi avaliada no sangue periférico dos animais pela técnica de citometria de fluxo nos tempos indicados, fenotipando leucócitos humanos e murinos que expressavam CD45 (Fig. 14A). Nossos resultados demonstram que a injeção de PBMC's humanos promoveu humanização média acima de 40%, visto que foi possível detectar células expressando CD45 humano na corrente sanguínea dos animais e, portanto, considerada satisfatória, de acordo com os critérios previamente estabelecidos. De modo interessante, essa humanização foi dependente do doador, onde cada doador gerou uma resposta (Fig. 14B). As amostras dos doadores que tiveram uma reconstituição média acima de 40% 14 dias após a injeção com PBMC's foram analisadas e observamos, ao longo do tempo, um aumento de células expressando CD45 humano no sangue dos animais, com diferença significativa nos dias 14 e 19 quando comparados aos dias 0 e 7. O maior aumento foi visto no dia 19 pós injeção de PBMC's, com cerca de 60% de humanização no período avaliado (Fig. 14C). Não continuamos a avaliação pois a humanização já se mostrava significativa. Sendo assim, após a confirmação da humanização, os camundongos foram eutanasiados e foi feita uma caracterização dos leucócitos no sangue total dos animais. Os dados indicam que cerca de 60% do total de células que obtivemos no sangue dos camundongos eram células humanas expressando CD45. Desses 60%, quase 100% são linfócitos expressando CD3, de modo que eles são segregados em células CD4 (~50%) ou CD8 (~50%) e em nenhuma dessas populações observamos marcação de linfócitos B, células dendríticas ou monócitos (Fig. 14D).

A



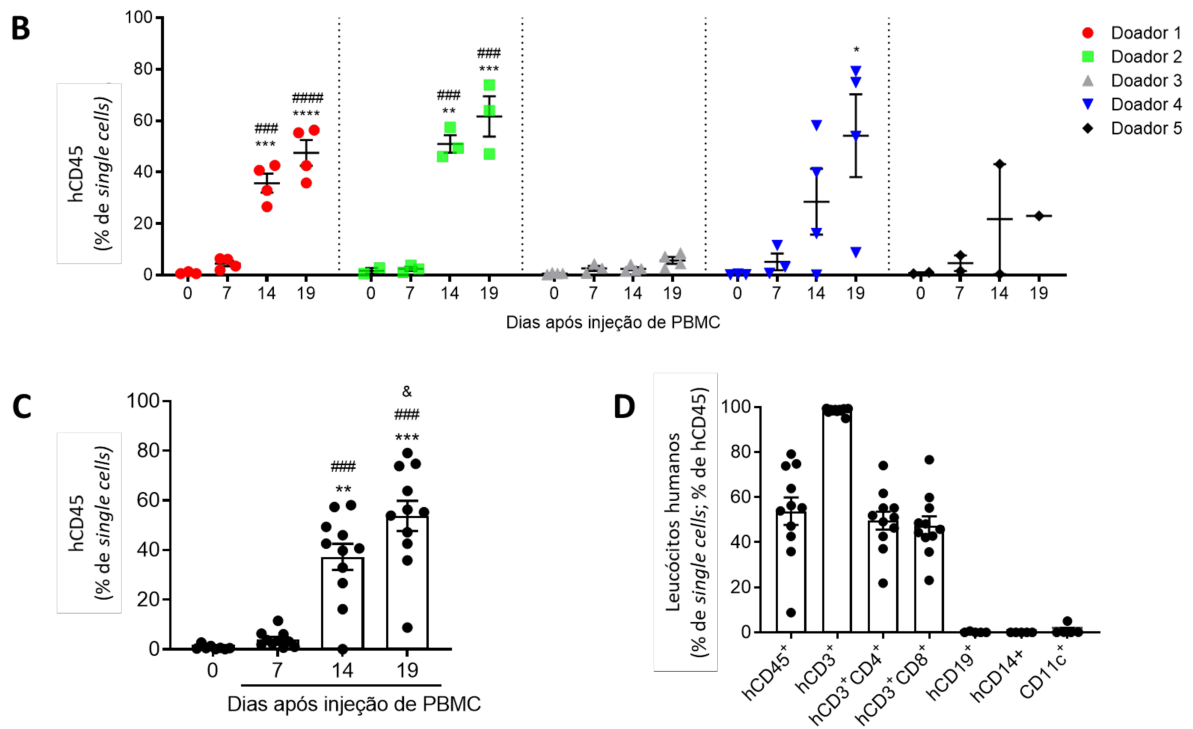


Figura 14: Estratégia de humanização e caracterização do perfil celular no sangue periférico de camundongos NSG enxertados com PBMC humano proveniente de doadores saudáveis.

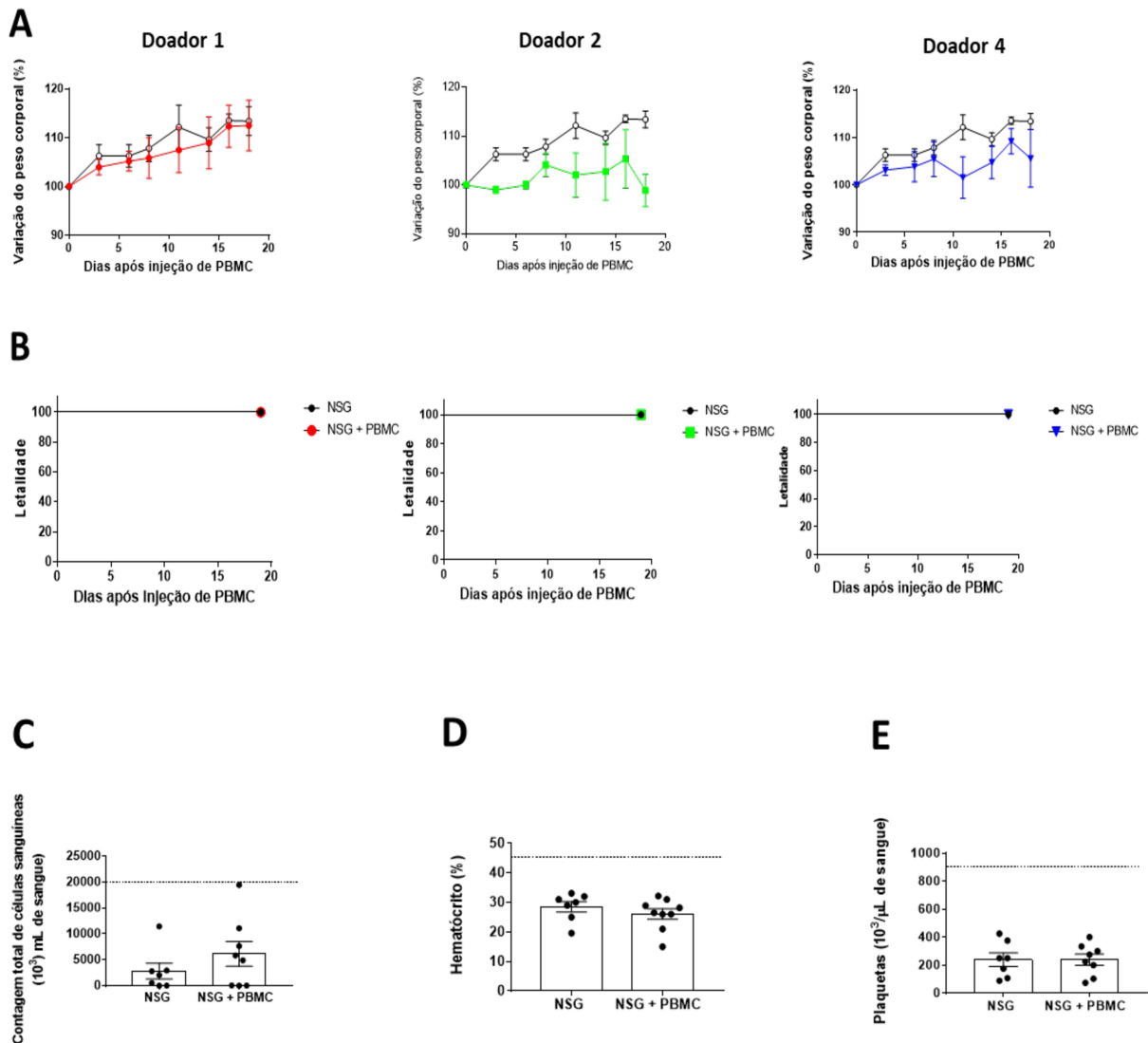
Camundongos NSG foram inoculados por via intravenosa com 5×10^6 PBMC's isolados de diferentes doadores e a taxa de humanização foi avaliada no sangue periférico semanalmente pelo método de citometria de fluxo. A humanização foi representada como frequência de células leucócitos humanos (hCD45⁺) no sangue periférico dos animais. (A) Esquema experimental da geração de camundongos humanizados a partir de PBMC de doadores saudáveis. (B) Perfil de humanização por doador de PBMC. * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0005$ versus D0. #### $p < 0.005$ e ##### $p < 0.0005$ versus D7. & $p < 0.05$ versus D14. Nos gráficos, as colunas representam a média e as barras de erro representam o erro padrão da média (EPM).

9.5 Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e histopatológicos dos animais humanizados a partir de PBMC humano proveniente de doadores saudáveis.

Juntamente à humanização e à caracterização do perfil celular, no dia 19 após injeção de PBMC's, acompanhamos o peso e letalidade, se essa humanização induzia algum sinal clínico e não observamos mudanças significativas. Dos animais que humanizaram, podemos perceber que a humanização não foi associada a perda de peso e morte (Figs. 15A-B). Adicionalmente, não observamos alterações nos parâmetros sanguíneos avaliados como hematócrito, plaquetas e contagem de células mononucleares dos animais humanizados quando comparados aos animais não humanizados (Figs. 15C-E). O escore histopatológico feito leva

em consideração alguns parâmetros como edema, hemorragia, infiltrado inflamatório, degeneração, necrose. Esses parâmetros são pontuados de acordo com o grau da lesão, como indicado na tabela 6. A intensidade do processo inflamatório variou desde ausência de inflamação até inflamação mínima no dia 19 após injeção de PBMC's, apresentando aumento no processo inflamatório nos camundongos humanizados (Fig. 15F).

A análise histopatológica do fígado (Fig. 15G) de animais humanizados e não humanizados demonstrou um recrutamento de células nos animais humanizados (Fig. 15G-1 e 2). Nas imagens com marcação, o controle negativo não recebeu anticorpo anti-hCD45 (Fig. 15G-3). Na figura 15G-4, o anticorpo anti-hCD45 foi aplicado. Após a marcação das células hCD45, é possível observar as células inflamatórias em marrom, indicando que o infiltrado é formado por células humanas.



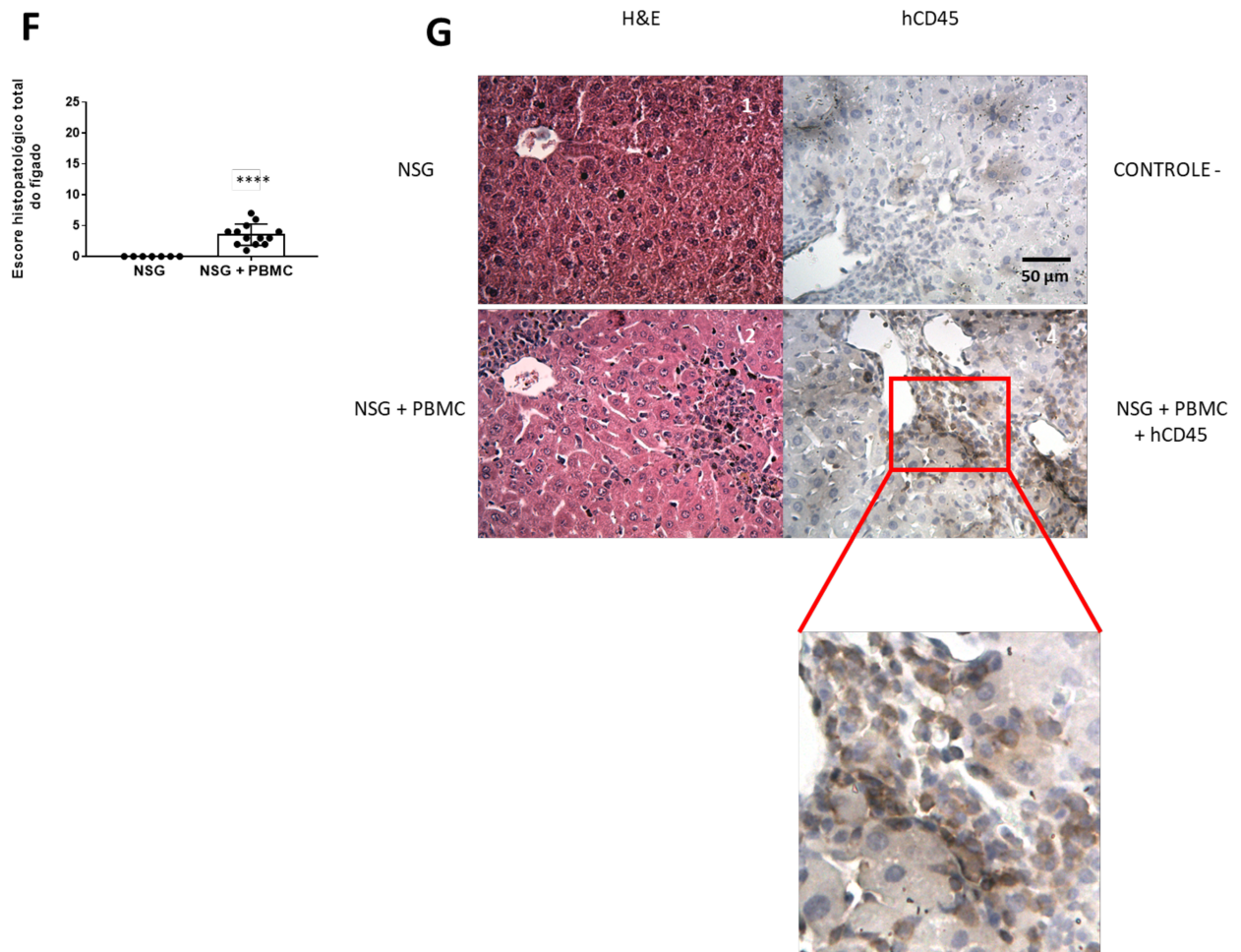
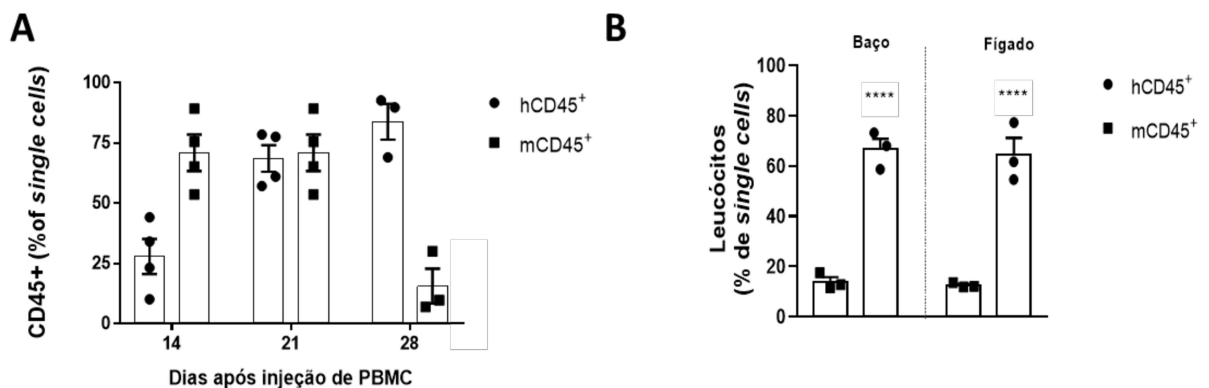


Figura 15: Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e histopatológicos dos animais humanizados a partir de PBMC humano proveniente de doadores saudáveis.

Conforme esquema da figura 14A, camundongos NSG foram inoculados por via intravenosa com 5×10^6 PBMC's de diferentes doadores e os animais que humanizaram foram avaliados ao longo do tempo (A e B) e 19 dias após inoculação (C-G). (A) Percentual de variação de peso corporal e (B) curva de letalidade dos grupos de animais que apresentaram percentual médio de hCD45⁺ superior a 40% a partir do 14º dia após injeção de PBMC (doadores 1, 2 e 4; Figura 15). (C-E) Análises hematológicas realizadas no dia 19 após a injeção de PBMC's. Os gráficos representam o perfil hematológico de três grupos de animais individualmente enxertados com células mononucleares provenientes dos doadores 1, 2 e 4 (Figuras 15A-B). As linhas tracejadas representam os valores mínimos hematológicos de referência de animais selvagens. (C) Contagem total de células brancas por mililitro de sangue. (D) Níveis de hematócrito expressos como porcentagem do volume ocupado pelos eritrócitos. (E) Quantificação de plaquetas no sangue total expressas como plaquetas por microlitros de sangue. (F) Escore histopatológico do fígado dos animais no dia 19. Barras de erro do gráfico mostram erro padrão da média (EPM); barras horizontais no *dot plot* mostram valores da média. **** $p < 0.05$. (G) Cortes histológicos de fígados obtidos no dia 19 após injeção de PBMC. (G-1-2) Coloração H&E de seções do fígado de camundongos NSG (1) e NSG + PBMC (2). (G-3-4) Marcação de células CD45 humanas por imunohistoquímica no fígado de camundongos NSG + PBMC 19 dias após injeção de PBMC. (G3) Amostra de humanizado sem anticorpo controle negativo da reação. (G-4) Amostra de humanizado com anticorpo anti-hCD45. Em destaque, aumento da Barra de escala = 50 µm. Os gráficos em A e B representam animais humanizados com PBMC's de diferentes doadores, individualmente.

9.6 O perfil de leucócitos após a humanização com PBMC's no sangue e em outros órgãos foi inteiramente de linfócitos.

Após o sucesso na humanização de camundongos NSG a partir de PBMC's de doadores saudáveis, foi feita a caracterização dos leucócitos no sangue periférico e em outros órgãos dos camundongos NSG humanizados. Em experimento independente, escolhemos um dos doadores utilizados no experimento de caracterização inicial e repetimos o experimento. A cinética de humanização demonstra que células humanas aumentaram ao longo do tempo. No dia 28 após a injeção de PBMC um animal foi excluído da análise de sangue, baço e fígado (Fig. 16A). Além da presença de leucócitos humanos no sangue, verificamos também a presença de leucócitos humanos no baço e fígado no dia 28 após injeção de PBMC com aumento significativo de células humanas em ambos os órgãos (Fig. 16B). Adicionalmente, nossos resultados indicam que as células CD45 humanas detectadas no fígado e no baço também expressavam majoritariamente o marcador CD3 de modo que, aparentemente, 50% das células eram linfócitos tipo CD4 e 50% tipo CD8. Não observamos presença de linfócitos expressando CD19 (Fig. 16C- D).



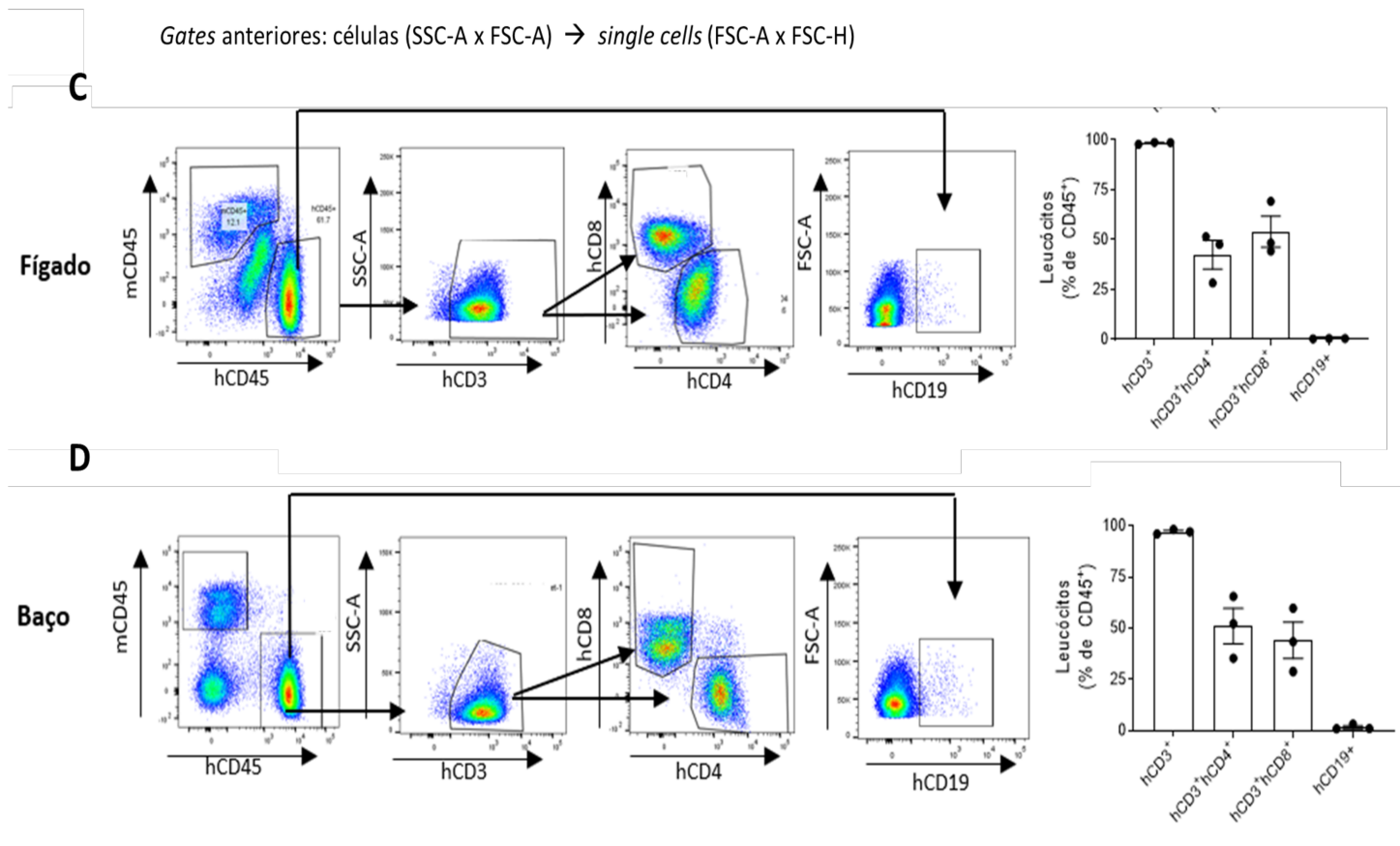


Figura 16: Avaliação do perfil de leucócitos humanos no sangue periférico, fígado e baço de camundongos NSG inoculados com PBMC's humanos de doadores saudáveis.

Em experimento independente, camundongos NSG foram inoculados com 5×10^6 células de PBMC's para avaliação do perfil de leucócitos humanos no sangue periférico, fígado e baço. (A) A taxa de humanização foi avaliada no sangue periférico semanalmente pelo método de citometria de fluxo e representada como frequência de células hCD45⁺ no sangue periférico dos animais. (B) Frequência de leucócitos humanos (hCD45⁺) e murinos (mCD45⁺) no baço e fígado dos animais NSG 28 dias após a injeção intravenosa de PBMC's humanos. *** $p > 0.0001$. (C-D) Estratégia de *gate* e *dot plots* representativos da frequência de leucócitos humanos (CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD19⁺), respectivamente no baço e fígado dos animais. Os gráficos representam a caracterização do fenótipo das células humanas circulantes no fígado e baço dos animais representados em C e D. Nos gráficos, as colunas representam a média e as barras de erro representam o erro padrão da média (EPM).

9.7 Avaliação dos tipos celulares ao longo da cinética após inoculação dos PBMC's.

Para verificar se os tipos celulares eram os mesmos ao longo do tempo, avaliamos as células no sangue periférico nos dias 0, 7, 14 e 19. A Figura 17A representa a estratégia de *gate* utilizada para avaliação dos tipos celulares ao longo do tempo, a partir de um animal representativo. No dia 0, como ainda não havia reconstituição, as análises posteriores não foram representadas. A Figura 17B representa as células predominantes nesse modelo. Nossos resultados demonstram que os leucócitos humanos aumentaram no dia 14 e o pico de

reconstituição ocorreu no dia 19 após a injeção de PBMC's. Destes leucócitos encontrados, as células predominantes nos tempos avaliados eram linfócitos expressando CD3.

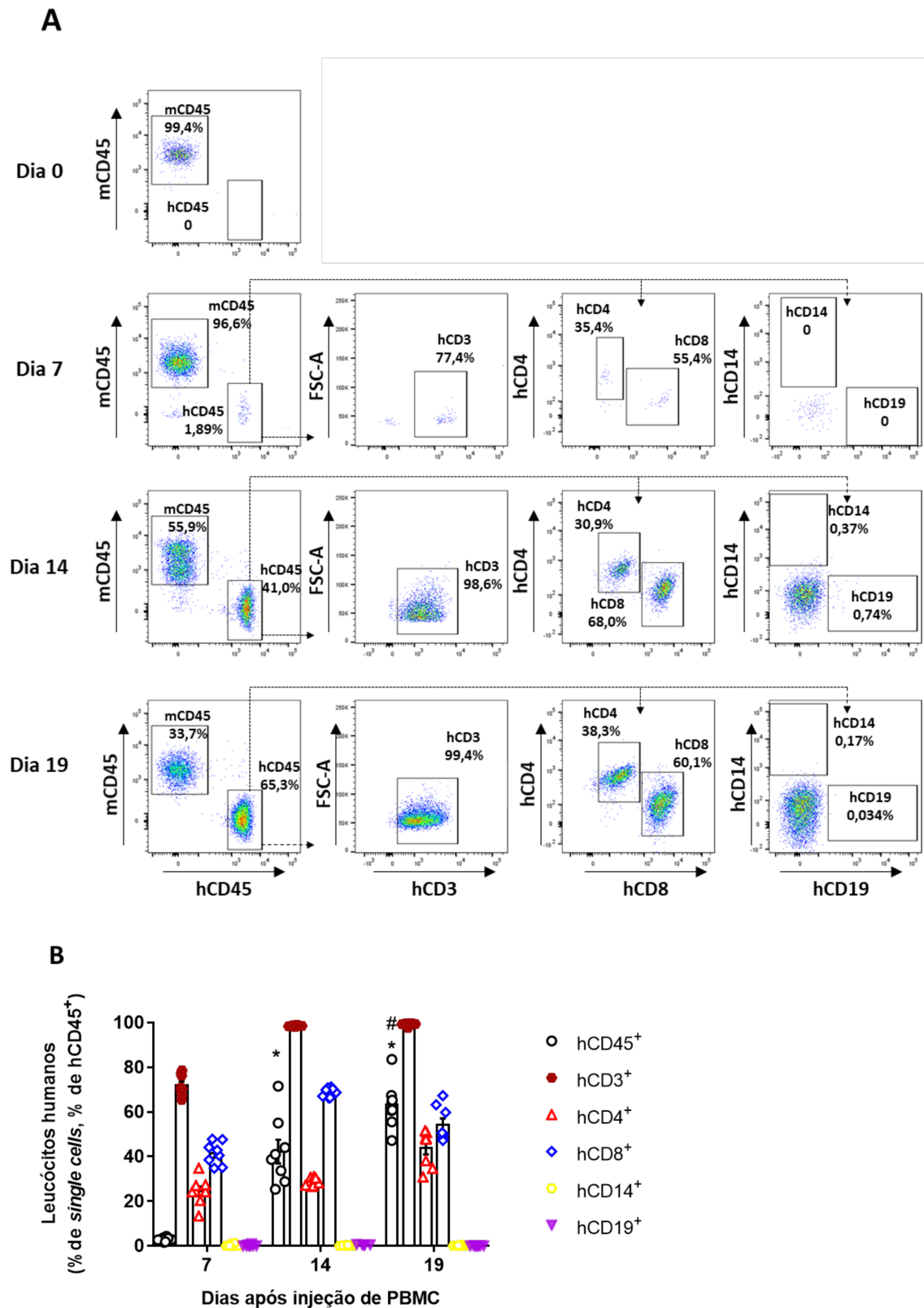


Figura 17: Avaliação do fenótipo dos leucócitos humanos circulantes no sangue periférico de animais NSG ao longo do tempo após a inoculação dos PBMC's.

Após a análise dos tipos celulares no tecido, foi feita uma avaliação para verificar a frequência de cada população de leucócito humano em diferentes tempos após o enxerto. (A) Estratégia de *gate* e *dot plots* representativos dos tipos celulares avaliados nos dias 0, 7, 14 e 19. (B) Gráfico representativo dos tipos celulares nos dias 7, 14 e 19 após a injeção de PBMC's nos animais NSG. Resultado representado como frequência de leucócitos humanos hCD45⁺ dentre as *single cells* (primeira coluna) ou como frequência de cada tipo celular dentre os leucócitos humanos circulantes (demais colunas). Nos gráficos, as colunas representam a média e as barras de erro representam o erro padrão da média (EPM). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$.

9.8 Infecção de camundongos humanizados pelo Dengue vírus.

Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento da doença no animal NSG e no NSG humanizado, primeiramente injetamos PBMC's de doadores saudáveis e sem prévia exposição ao vírus da dengue e acompanhamos a reconstituição de leucócitos humanos ao longo do tempo. A Figura 18A representa o esquema experimental da humanização e infecção dos animais NSG utilizados neste experimento. Após a injeção de PBMC's, os animais foram acompanhados, nos tempos indicados na Figura 18A. No dia 39 após a injeção de PBMC's, os animais que apresentaram um percentual médio de reconstituição de células humanas de 40% foram infectados por DENV-2 (3295: *Genbank* EU081177.1), por injeção i.v. de 1×10^6 PFU. A cinética de humanização até o dia da infecção deste experimento está representada na Figura 18B. Observamos um aumento na reconstituição nos dias 7, 14 e 39 quando comparados ao dia 0. De maneira semelhante, esse aumento foi significativo nos dias 14 e 39 quando comparados ao dia 7, e o pico da reconstituição aconteceu no dia 39. Para avaliar se a reconstituição de células humanas se mantinha após a infecção, foi feita uma cinética. A Figura 18C representa a cinética de humanização após a infecção por DENV-2. Nossos resultados indicam que, após a infecção, não houve diferença na reconstituição de leucócitos humanos.

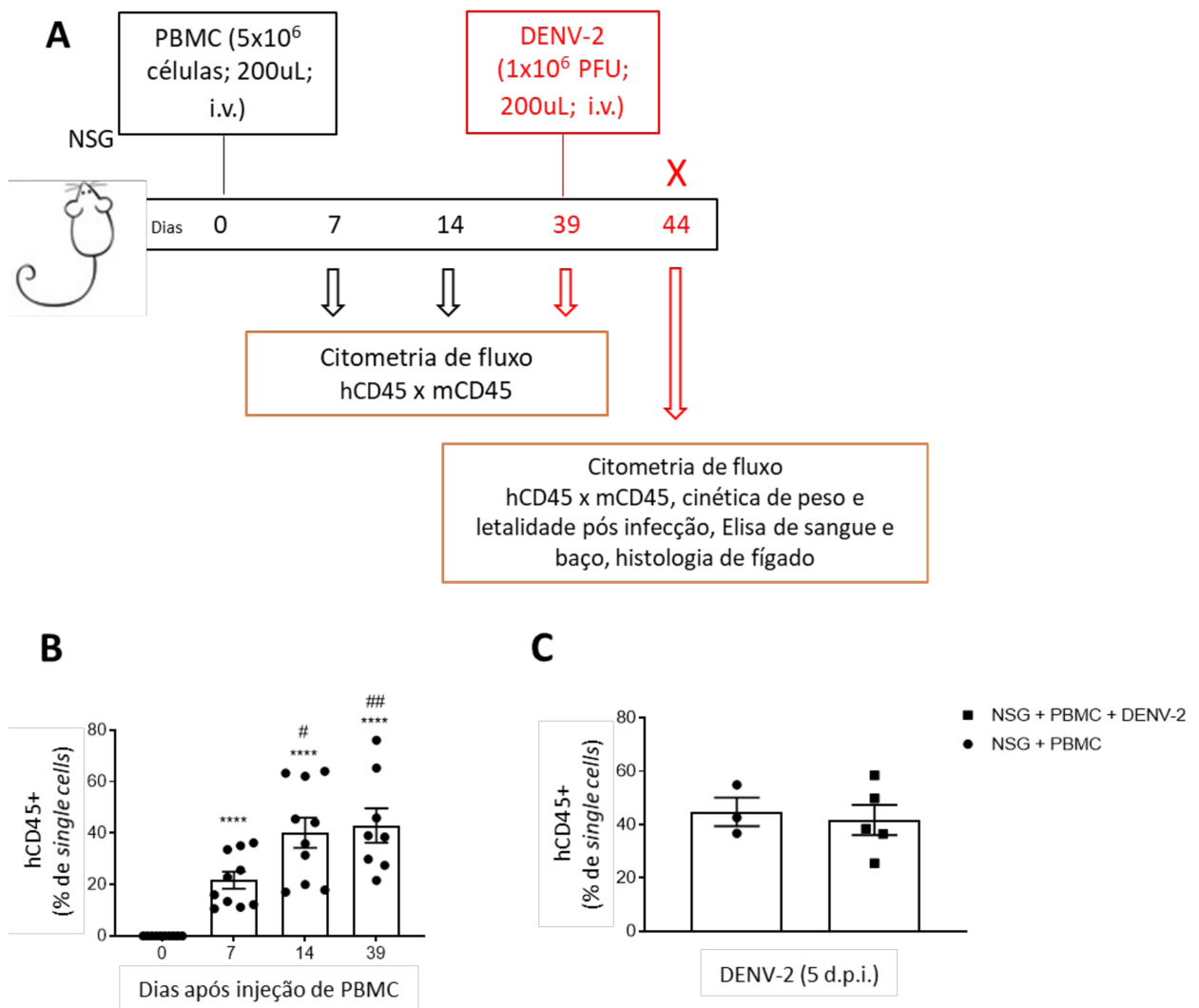


Figura 18: Infecção dos camundongos NSG pelo Dengue vírus.

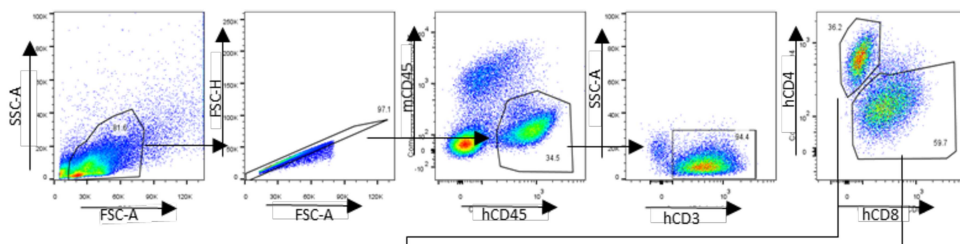
Após a humanização, os camundongos foram infectados com DENV-2 3295-DK1 pela injeção i.v. de 1×10^6 PFU/animal. (A) Esquema experimental da infecção dos camundongos NSG por DENV-2. (B) Cinética de humanização dos animais ao longo do tempo. (C) Frequência de leucócitos humanos no sangue periféricos dos animais NSG cinco dias após a infecção avaliada por meio da técnica de citometria de fluxo. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0005$ em relação ao dia 0. # $p < 0.05$, ### $p < 0.005$ em relação ao dia 7. Coluna representa a média e barra de erro representa o erro padrão da média (EPM).

9.9 Avaliação da expressão do marcador de ativação $INF\gamma$ por leucócitos humanos provenientes de camundongos humanizados após a infecção por DENV-2.

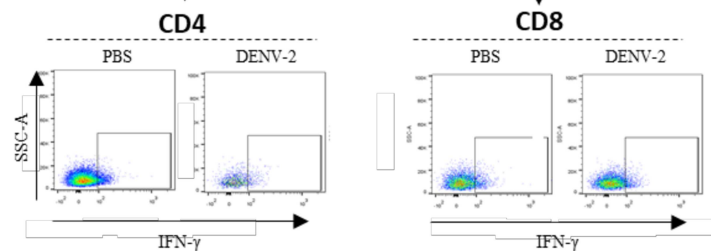
Para investigar a funcionalidade e a responsividade dos leucócitos humanos após a infecção pelo DENV-2 descrito na figura 18, a expressão da citocina $INF\gamma$ foi avaliada no sangue e no baço dos animais, 5 dias após a infecção. Primeiramente, foi feita a estratégia de *gate* para fenotipagem das principais populações de leucócitos encontradas ($hCD45^+hCD3^+hCD4^+$ e $hCD45^+hCD3^+hCD8^+$) (Fig. 19A). A figura 19B demonstra a estratégia de *gate* para avaliação da funcionalidade dos linfócitos CD4 e CD8 dos animais

infectados e não infectados que expressavam $\text{INF}\gamma$. Nossos resultados demonstram não ter havido alterações na expressão de $\text{INF}\gamma$. Como pode ser observado na figura 19C, não houve alteração na produção de $\text{INF}\gamma$ pelas células TCD4 e TCD8 do sangue dos animais humanizados e humanizados e infectados. Somente foi possível observar aumento de $\text{INF}\gamma$ nas células TCD4 do baço dos animais humanizados e infectados quando comparado ao grupo somente humanizado (Figura 19D, painel esquerdo).

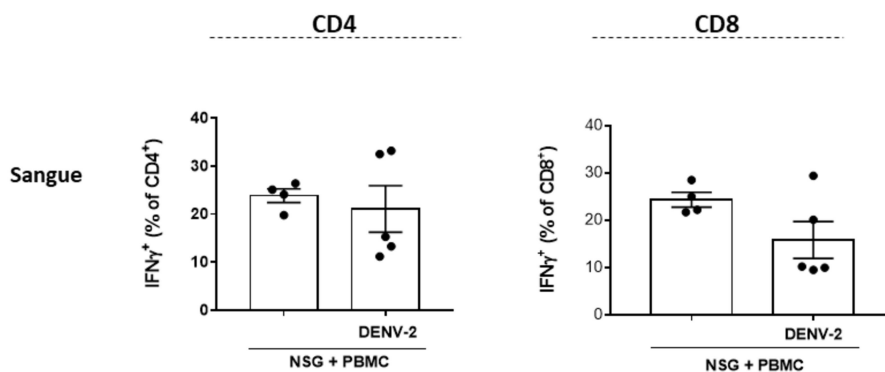
A



B



C



D

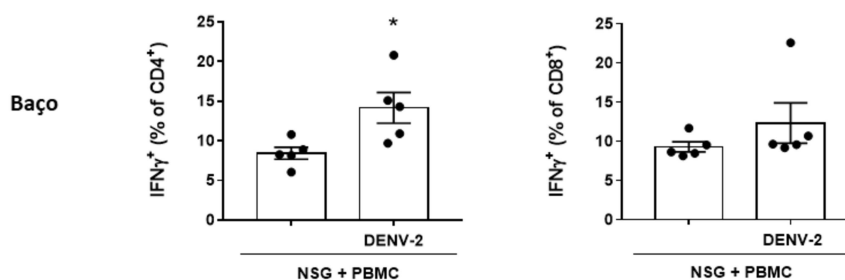


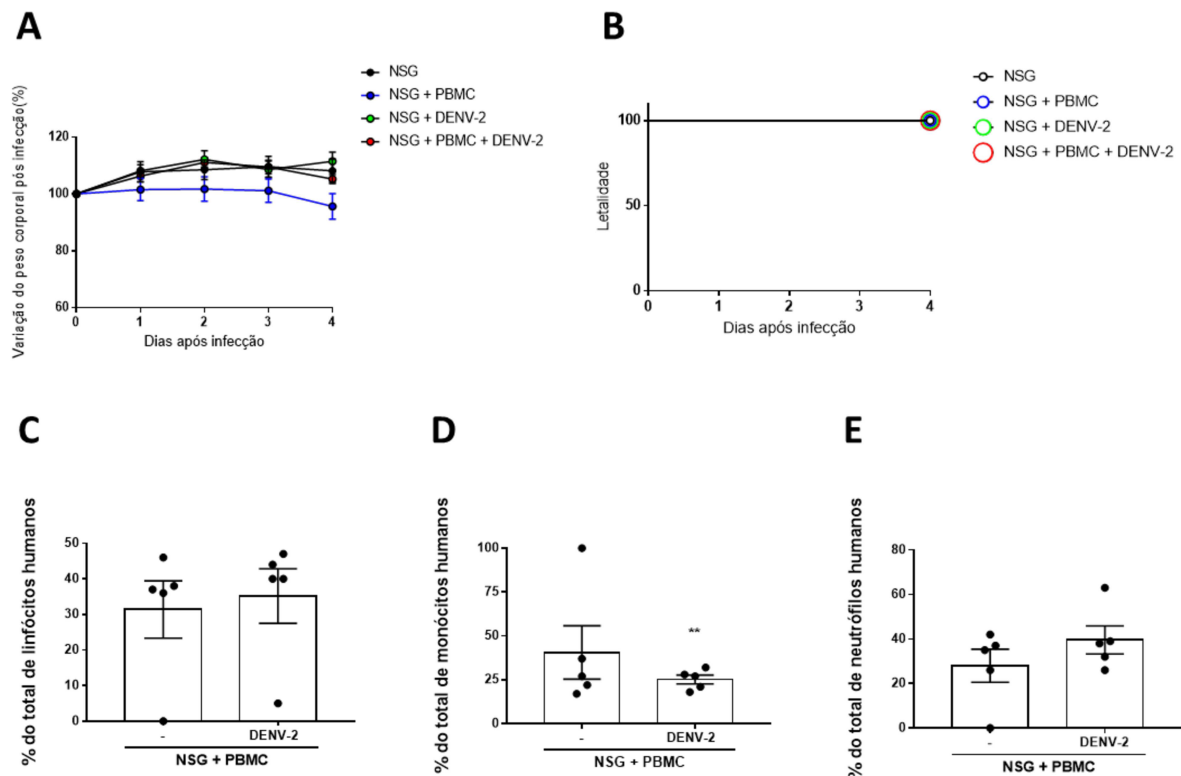
Figura 19: Leucócitos humanos provenientes de camundongos humanizados não são ativados pela infecção por DENV-2 in vivo, exceto em linfócitos TCD4 no baço, que respondem produzindo INF γ .

Camundongos NSG humanizados foram infectados com 1×10^6 PFU de DENV-2 assim como descrito na figura 18A. (A) Leucócitos humanos (hCD45) foram fenotipados quanto à expressão de marcadores CD4 e CD8 por meio da técnica de citometria de fluxo. (B) Em seguida, os linfócitos TCD4 e TCD8 foram avaliados quanto à expressão de citocina (INF γ). (C-D) Gráficos representativos das análises referentes à figura B mostrando a expressão INF γ nos linfócitos TCD4 e TCD8 no sangue e baço dos animais NSG infectados pelo DENV-2. A expressão da citocina INF γ foi expressa em porcentagem de células. Resultados representados por picogramas/mL. Quantificação feita por ELISA. * para $p < 0.05$ em relação ao grupo NSG + PBMC.

9.10 Parâmetros clínicos, hematológicos e histopatológicos dos animais humanizados e infectados por DENV-2.

Os animais infectados com DENV-2 foram acompanhados por 5 dias após a infecção e os parâmetros clínicos como peso (Fig. 20A) e letalidade (Fig. 20B) foram avaliados. Os resultados mostram que a infecção pelo vírus não induziu perda de peso ou morte dos animais nos grupos avaliados. De maneira geral, camundongos selvagens possuem linfócitos como sendo as células predominantes no seu perfil celular. Porém, camundongos NSG não possuem células T, B e NK, e seu perfil predominante é de neutrófilos. Nesse sentido, avaliamos o percentual de leucócitos nos grupos. Nossos resultados demonstram que não houve diferença no número de linfócitos e neutrófilos circulantes (Fig. 20C e E). De maneira interessante, observamos uma redução do número de monócitos no grupo humanizado e infectado (Fig 20D). Tal resultado pode indicar uma supressão na resposta imune inata. Além disso, avaliamos outros parâmetros hematológicos. A avaliação de hematócrito não indicou diferenças entre os grupos avaliados (Fig. 20F) e a avaliação de plaquetas dos animais indicou aumento no grupo infectado podendo indicar aumento de atividade de megacariócitos na medula (Fig. 20G). No entanto, a medula dos animais não foi avaliada nesse estudo. Por fim, a capacidade em induzir lesão hepática foi avaliada. Nossos resultados demonstram que houve um maior infiltrado de células inflamatórias no grupo humanizado quando comparado ao grupo não humanizado e não houve diferença no grupo humanizado e infectado, demonstrando que a infecção não induziu maior aumento de infiltrado inflamatório no tecido (Fig. 20I). A intensidade desse processo variou desde ausência de inflamação até inflamação mínima no dia 5 após infecção por DENV-2 (Fig. 20I). Nas imagens de marcação, o anticorpo anti-hCD45 foi aplicado (Fig. 20H-4 a 6). A análise do fígado do grupo NSG ilustra a integridade tecidual (Fig. 20H-1). A figura 20H-2 corresponde à análise histopatológica de um animal do grupo humanizado. Nessa análise, podemos observar

um discreto aumento no recrutamento celular. O grupo infectado apresenta um infiltrado celular mais intenso (Fig. 20H-3). Imagem de imuno-histoquímica de animal NSG sem a presença de células humanas (Fig. 20H-4). Na figura 21H-5 e 6, as células inflamatórias marrons são as células marcadas, ou seja, são células mononucleares presentes no infiltrado inflamatório de animais humanizados e humanizados e infectados, respectivamente. Os hepatócitos não estão marcados. Interessante notar que, no infiltrado inflamatório, há tanto células marcadas como células não marcadas, o que indica que o infiltrado é formado tanto por células humanas quanto por células dos camundongos. Dentro dos vasos sanguíneos também é possível notar células marcadas, o que indica que as células humanas, de fato, estão circulando (Fig. 20H-5 em destaque). Controle negativo (sem anticorpo anti-hCD45) está representado na figura 20H-7. Nessa imagem, não foi aplicado o anticorpo. Assim, o infiltrado inflamatório não está marcado. Logo, podemos concluir que as células marcadas nos cortes com anticorpo são mesmo células CD45⁺ humanas, visto que, na ausência do anticorpo, elas não marcaram, ou seja, a reação foi específica.



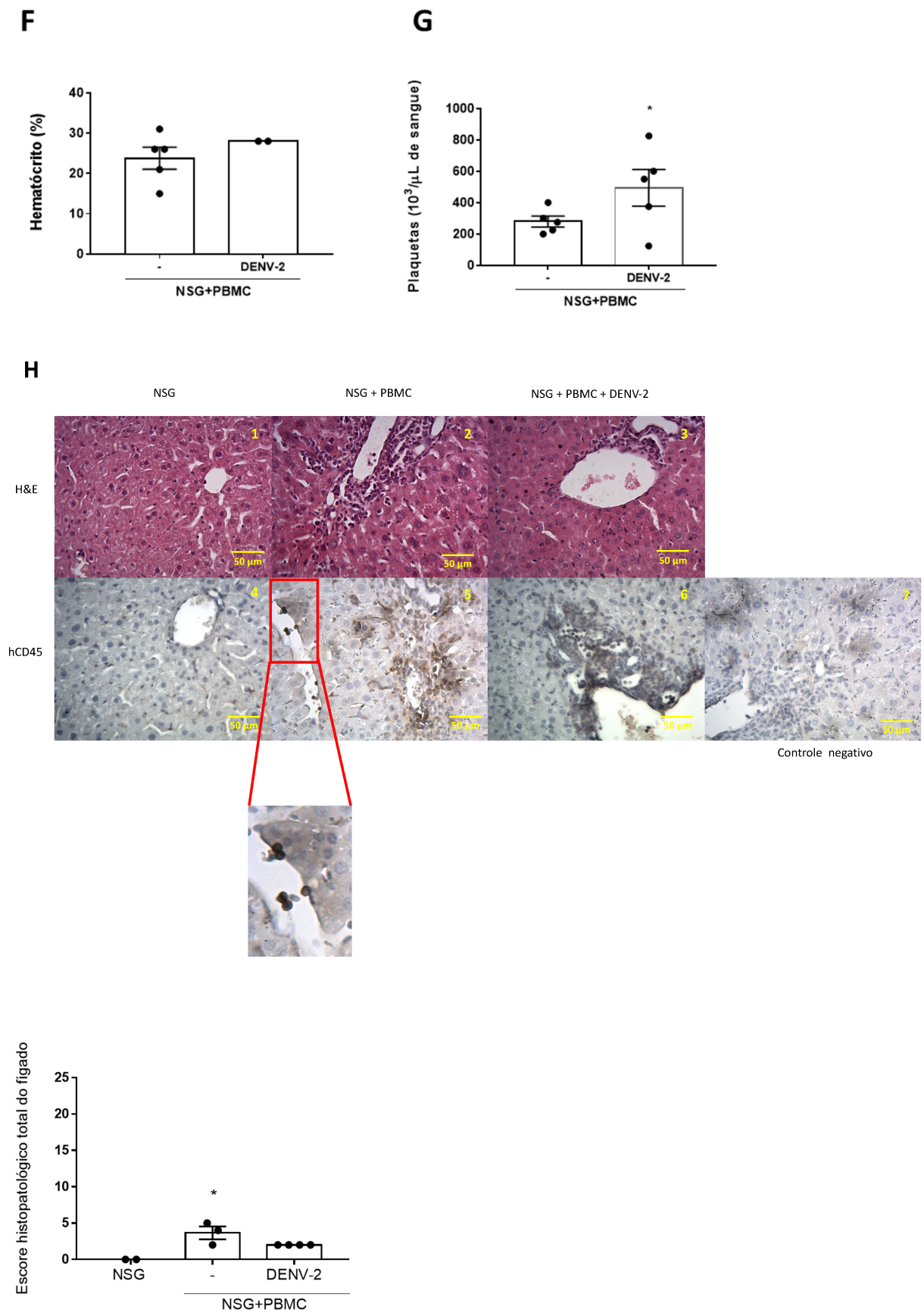


Figura 20: Avaliação dos parâmetros clínicos, hematológicos e histopatológicos dos animais humanizados e infectados com Dengue vírus.

Conforme esquema da figura 19A, camundongos NSG humanizados foram infectados por DENV-2 3295-DK1 pela injeção i.v. de 1×10^6 PFU i.v. e as avaliações feitas no dia 5 pós infecção por DENV-2. (A) O gráfico representa a variação de peso corporal dos grupos avaliados a partir do dia da infecção. (B) Curva de letalidade expressa em porcentagem. (C) Contagem total de linfócitos expresso como porcentagem. (D) Contagem total de monócitos expresso como porcentagem. $**p < 0.005$ em relação ao grupo NSG. (E) Contagem total de neutrófilos expressa em porcentagem. (F) Níveis de hematócrito expresso como porcentagem do volume ocupado pelos eritrócitos. (G) Quantificação de plaquetas no sangue total expressas por microlitro de sangue. (H1 a H3) Coloração H&E de seções do fígado dos grupos NSG, NSG + PBMC e NSG + PBMC + DENV-2, respectivamente. (H4 a H6) Marcação de células hCD45 por imunohistoquímica no fígado de camundongos NSG, NSG + PBMC e NSG + PBMC + DENV-2, respectivamente, 5 dias após infecção com DENV-2 (G5) Em destaque, presença de células humanas dentro dos vasos. (G7) Controle não marcado. Barra de escala = 50 μm . (I) Score histopatológico do fígado dos animais. Barras de erro do gráfico mostram erro padrão da média (EPM); barras horizontais no *dot plot* mostram valores da média. $* p < 0.05$ em relação ao grupo NSG.

9.11 Avaliação da carga viral nos camundongos hu-PBMC's.

O próximo passo foi verificar se esses leucócitos humanos foram infectados pelo DENV-2. Nesse sentido, após a eutanásia dos animais humanizados e infectados, procedemos para um ensaio de titulação de placas para recuperar carga viral viável. O resultado da titulação demonstrou que apenas 3 amostras de 13 tiveram título detectável (2×10^2 , 3×10^2 e 5×10^2). Portanto, como a técnica de titulação não teve sensibilidade suficiente dentro do modelo e condições testadas, partimos para a análise da presença da proteína NS3 viral nesses leucócitos humanos pelo método de citometria de fluxo. A detecção de NS3 por citometria de fluxo também possui a vantagem de distinguir células humanas e murinas infectadas pelo DENV. A figura 22 mostra os *dot plot* representativos da expressão da proteína NS3 nas células humanas circulantes 3 e 5 dias após a infecção pelo DENV no sangue (figura 21A) e no baço 5 dias após a infecção (figura 21B). Nas condições testadas, o DENV não foi capaz de infectar as células humanas no modelo hu-PBMC. Esse resultado justifica, pelo ao menos em parte, a semelhança nos sinais clínicos dos animais NSG e NSG + PBMC infectados com DENV e a ausência de uma doença mais grave nos animais humanizados.

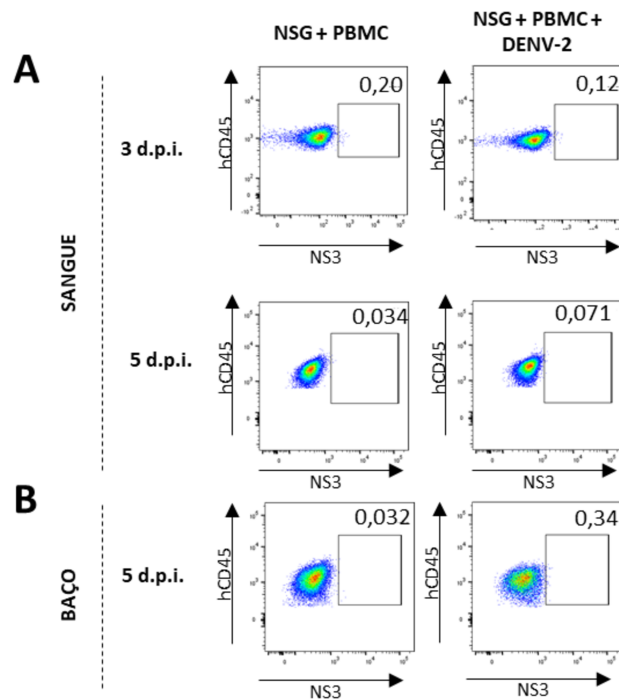


Figura 21: Avaliação da expressão da proteína NS3 viral em leucócitos humanos de camundongos humanizados e infectados pelo Dengue vírus.

Conforme esquema da figura 18A, camundongos NSG humanizados foram infectados com DENV-2 3295-DK1 pela injeção i.v. de 1×10^6 PFU i.v. e as avaliações feitas nos dias 3 e 5 após a infecção com DENV-2. (A) *Dot plots* representativos da expressão de NS3 nos leucócitos humanos ($hCD45^+$) circulantes no sangue periférico dos animais hu-NSG infectados ou não com DENV. O sangue periférico foi coletado para avaliação 3 e 5 dias após a infecção. B) *Dot plots* representativos da expressão de NS3 nos leucócitos humanos ($hCD45^+$) presentes no baço de animais hu-NSG infectados ou não com DENV. O baço foi coletado para avaliação 5 dias após a infecção. d.p.i.= dias pós infecção.

10. DISCUSSÃO

Os modelos murinos são ferramentas indispensáveis para o entendimento da patogênese de diversas doenças e no desenvolvimento de uma ampla variedade de abordagens terapêuticas (AKKINA, 2013). Apesar da grande contribuição que os estudos em camundongos têm fornecido nas últimas décadas, inúmeros componentes dos sistemas biológicos murinos diferem daqueles observados em humanos, particularmente no que diz respeito ao sistema imune. Essas divergências limitam consideravelmente a utilização de muitos dos modelos murinos desenvolvidos até o momento, quando se pretende responder perguntas biológicas envolvendo aspectos específicos da biologia humana (WALSH *et al.*, 2017). Assim, existe um esforço constante para o desenvolvimento de modelos experimentais que supram a necessidade de se estudar de maneira sistemática e controlada, as respostas imunes humanas frente a diferentes estímulos, sejam eles de origem estéril ou infecciosa (CHEN *et al.*, 2009; LEGRAND *et al.*, 2009, DRAKE *et al.*, 2012).

Ainda, um dos maiores desafios no desenvolvimento de drogas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças humanas de importância médica está na elevada taxa de falha (~40%) ou reduzida eficácia destes compostos durante os testes clínicos em fase II em seres humanos (LEGRAND *et al.*, 2009; DRAKE, CHEN, CHEN, 2013). A ausência dessa eficácia, sugere, pelo menos em parte, que os métodos de *screening* pré-clínico utilizados rotineiramente não mimetizam de maneira fidedigna os parâmetros clínicos da doença como vista em humanos. Estes estudos são geralmente baseados na utilização de sistemas de cultura *in vitro* (deficientes nas interações fisiológicas) assim como em modelos experimentais que muitas vezes falham em mimetizar adequadamente a natureza dessas condições patológicas. O recente desenvolvimento da tecnologia dos modelos humanizados tem ajudado a reduzir estas falhas e minimizar tais fracassos (DRAKE, CHEN, CHEN, 2013, DRAKE *et al.*, 2012).

Grandes avanços têm sido alcançados no aprimoramento dos modelos de hu-camundongos, e a geração de camundongos portadores de mutações no gene *IL2rg* foi, sem dúvida, o passo-chave para o sucesso dos hu-camundongos. A cadeia comum γc ou *IL2rg*, é um componente importante compartilhado por vários receptores de citocinas e indispensável para a sinalização fisiológica desses receptores. Camundongos com mutações no gene *Prkdc* (*Prkdc^{scid}*) associadas com mutações no *IL2rg* não possuem imunidade adaptativa, incluindo a ausência de células *natural killer* (NK). Atualmente, existem algumas linhagens de camundongos *IL2rg^{null}* imunodeficientes, incluindo os NOD.Cg-*Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}* (NSG) (DRAKE *et al.* 2012). Camundongos NSG combinam a ausência de atividade de células T e

células B do camundongo *SCID* e a reduzida atividade de macrófagos do camundongo NOD com a ausência de atividade de células NK devido à ausência da expressão de IL-2R γ (EHX *et al.* 2018).

Estes modelos oferecem, não somente uma oportunidade de estudo da fisiopatologia de doenças humanas, como também possibilitaria o teste pré-clínico de drogas (WALSH *et al.* 2017). Além disso, grandes avanços nas pesquisas têm sido feitos usando esse modelo animal como ferramenta de estudo de vários sistemas biológicos, de respostas imunológicas exclusivamente humanas (ALLEN *et al.*, 2017, BREHM; SHULTZ; GREINER, 2010, SHULTZ; ISHIKAWA; GREINER, 2007; LAN *et al.*, 2006; ANDRE *et al.*, 2010).

Baseado na especificidade do patógeno a ser estudado, nas necessidades experimentais e no modo de preparação, diversas fontes de células humanas vêm sendo empregadas na construção do modelo que melhor atenda aos requisitos da pesquisa a ser realizada (AKKINA, 2013). Assim, para este trabalho, investigamos três fontes de células para humanização de camundongos NSG: i) Fígado fetal humano; ii) Bolsa de leucoaférese; iii) Células mononucleares do sangue periférico – PBMC.

A recuperação de células progenitoras CD34⁺ a partir do fígado fetal sofre influência de múltiplos fatores que podem ser definidos como pré-analíticos e analíticos. Idealmente, as amostras devem ser processadas imediatamente após a coleta. De acordo com a literatura, os fígados provenientes de fetos abortados entre 16 e 28 semanas de gestação são fontes ideais dessas células (AKKINA, 2013, CUI *et al.* 2017, DUAN *et al.* 2011, LEGRAND *et al.* 2009) e a presença de células humanas no sangue periférico dos animais enxertados com essa fonte de células permanece detectável por até 16 semanas (DUAN *et al.* 2011). Alguns países consideram o aborto legal, o que facilita o acesso dos pesquisadores a fígados fetais em idade gestacional ótima para a obtenção de células-tronco hematopoiéticas com alta viabilidade e rendimento. No Brasil, a legislação acerca do aborto é proibitiva, exceto quando há risco de morte da mãe, quando a gravidez é resultado de estupro e/ou quando o feto é anencéfalo (não tem cérebro). Assim sendo, a obtenção de amostras de fígado fetal nas idades gestacionais recomendadas na literatura é dificultada, ocorrendo apenas nas situações acima mencionadas ou quando o aborto é espontâneo. Neste trabalho, em parceria com o Hospital das Clínicas de Belo Horizonte, tivemos acesso a amostras de fígados de fetos natimortos ou mortos neonatais, variando de 36 a 40 semanas de gestação e uma única amostra de feto de 26 semanas de gestação (Tabela 3). Após o comunicado do óbito e retirada dos órgãos, as amostras foram transportadas até o nosso laboratório no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e processadas para isolamento de células-tronco hematopoiéticas CD34⁺. A análise por citometria de fluxo das

amostras após o processo de purificação, demonstrou uma viabilidade geral das células CD34⁺ humanas inferior a 7%. A baixa viabilidade das células-tronco hematopoiéticas verificada por citometria de fluxo foi confirmada visualmente pela técnica de azul de tripan seguida de análise ao microscópio de luz. Acreditamos que o tempo decorrido entre o óbito e o processamento das amostras pode ter causado uma perda de qualidade e viabilidade, inviabilizando a obtenção de um rendimento satisfatório de células viáveis (5×10^5 células/animal) para a continuação do experimento a partir dessa fonte de células. Uma sugestão que pode ser feita para esse modelo no sentido de otimizar a recuperação celular seria a utilização de fígados provenientes de fetos mais novos (COELHO-DOS-REIS *et al.* 2019), por possuírem alta capacidade de diferenciação e reconstituição, e serem imprescindíveis à diferenciação da linhagem mieloide. Adicionalmente, a utilização de animais neonatos irradiados, como no estudo conduzido por Rongvaux e colaboradores (2014), onde os pesquisadores utilizaram animais com 2 dias de vida irradiados e observaram o desenvolvimento de células do sistema imune inato (monócitos, macrófagos e células NK). Além disso, a redução do tempo transcorrido entre a recuperação do órgão e seu processamento também seriam opções para otimização do modelo.

Em seguida, como segunda fonte de células progenitoras CD34⁺, utilizamos bolsas de leucoaférese. Tais bolsas são obtidas a partir de um procedimento clínico onde o sangue do doador é removido do corpo através de uma sonda inserida em um dos braços, passa por um equipamento onde os leucócitos são separados para, então, retornar ao doador por meio de sonda inserida no braço contralateral (CASTILLO *et al.* 2018). Neste trabalho, confirmamos a viabilidade de se utilizar bolsas de leucoaférese como fontes de células CD34⁺ com rendimento e viabilidade adequados. Dessa forma, com o objetivo de se estabelecer um modelo de animais hu-HSC, animais NSG jovens (5 semanas) foram injetados intravenosamente com as células CD34⁺ recém purificadas. A fim de se estimular o amadurecimento dos leucócitos humanos no sangue periférico dos camundongos humanizados, administramos GM-CSF humano aos animais enxertados com as células progenitoras em três momentos. O GM-CSF é um fator de crescimento hematopoiético capaz de promover o desenvolvimento e maturação de células mieloides, assim como a diferenciação de células dendríticas (EGEA *et al.* 2010). No entanto, nas condições testadas, a taxa de humanização obtida foi inferior a 1%, conforme análise do sangue periférico por citometria de fluxo ao longo de quase 3 meses. Dessa forma, alterações protocolares se fazem necessárias no intuito de otimizar a humanização desses animais a partir da enxertia de CTH's provenientes de bolsas de leucoaférese. Por exemplo, a utilização de animais neonatos (24-36 horas de vida) seria uma possibilidade assim como previamente descrito por Akkina (2013) que indica que o enxerto em animais mais novos resulta na geração

de células T, células B, macrófagos, células NK e células dendríticas, assim como a irradiação dos camundongos como forma de criar um nicho na medula para reconstituição das células progenitoras, como demonstrado em estudos conduzidos por André *et al.* (2010) e Han *et al.* (2021), onde os camundongos utilizados no modelo de humanização a partir de células progenitoras CD34⁺ provenientes de bolsa de leucoaférese passaram por irradiação subletal antes do início do experimento. Como resultado, foi demonstrado uma eficiência robusta do enxerto e o desenvolvimento de múltiplas linhagens celulares linfóides a partir do enxerto de células CD34⁺ provenientes de leucoaférese. Ainda, André *et al.* 2010, comprovaram que a injeção de células suplementada com hIL-7, citocina importante no desenvolvimento de células B e T, demonstrou resultar em níveis elevados de desenvolvimento e diferenciação de células TCD3⁺. É descrito na literatura que a não reconstituição das células nesse modelo pode estar relacionada com a deficiência na suplementação de citocinas humanas necessárias para o desenvolvimento e manutenção das linhagens celulares (AMALADOSS *et al.* 2015). Assim, futuramente, a introdução e suplementação de citocinas que promovam crescimento e diferenciação pode aperfeiçoar a geração de modelos humanizados (ANDRÉ *et al.* 2010, HAN *et al.* 2021).

A partir desses resultados, demos continuidade ao estudo e avaliamos a viabilidade de se utilizar sangue periférico de doadores saudáveis (PBMC's) como fonte de células humanas para humanização de camundongos NSG. O modelo de PBMC's é o modelo mais simples, do ponto de vista técnico, para o desenvolvimento de camundongos humanizados, por ser um método de fácil obtenção de células e fácil enxerto (AKKINA, 2013). O uso desse modelo oferece um tempo de reconstituição menor e mais rápido (MORILLON *et al.* 2020), quando comparado ao modelo de leucoaférese, que leva meses para a reconstituição, como no estudo de André e colaboradores (2020), que acompanharam o desenvolvimento da linhagem linfóide por mais de 20 semanas após o transplante das células hematopoiéticas. No entanto, uma grande limitação desse modelo está no desenvolvimento precoce de GvHD, que ocorre devido ao reconhecimento das células T humanas pelo MHC murino, o que a torna uma complicação comum que ocorre em algumas terapias de transplante, além de ser uma causa comum de mortalidade (KING *et al.* 2008, KING *et al.* 2009). Adicionalmente, outra limitação no uso de PBMC's está no fato de não permitir a diferenciação em diferentes tipos celulares, uma vez que as células obtidas já estão maduras (AKKINA, 2013). Por este motivo, o uso do modelo de humanização a partir de PBMC's pode permitir o estudo sobre o papel das células na GvHD (TOBIN *et al.* 2013), assim como o estudo sobre a síndrome da tempestade de citocinas (YE *et al.* 2020). De forma semelhante, estudos indicam ser evidente a importância de um modelo

animal humanizado adequado que forneça uma plataforma para a investigação *in vivo* para o entendimento da biologia, fisiologia e fisiopatologia dos microrganismos causadores de enfermidades como doenças autoimunes: lupus (PEARSON *et al.* 2008, YOUNG *et al.* 2015, GUNAWAN, *et al.* 2017), GvHD (KING *et al.* 2008, KING *et al.* 2009), doenças do sistema imune (COVASSIN *et al.* 2013). Adicionalmente, resposta imune humana antitumoral (LI *et al.* 2019, MORILLON *et al.* 2020, HER *et al.* 2017, MERAZ *et al.* 2019), doenças virais como o HCV (KENG *et al.* 2015), HIV (KIM *et al.* 2016, BRAINARD *et al.* 2011, KOVAROVA *et al.* 2018), malária (AMALADOSS *et al.* 2015) e dengue (CUI *et al.* 2017, ZANINI *et al.* 2018), a qual os mecanismos patogênicos dessas doenças permanecem sem completa elucidação.

Sendo assim optamos, no presente trabalho, pelo uso do camundongo NOD/SCID/IL-2R γ^{null} (NSG) para o estabelecimento do modelo experimental humanizado como plataforma para o entendimento da resposta do organismo frente à infecção causada pelo vírus da dengue.

Uma vez estabelecido e caracterizado o modelo de hu-PBMC com boa janela terapêutica, nosso próximo objetivo foi comparar a infecção de animais NSG (não humanizados) e hu-NSG com um vírus com alto tropismo por células humanas, o DENV.

Neste contexto, para a definição do inóculo de células a serem injetadas, nos baseamos em estudos anteriores em nosso laboratório, nos quais utilizamos diferentes inóculos: 1×10^6 , 5×10^6 e 1×10^7 (dados não mostrados). O menor inóculo levou um tempo maior para reconstituir. Já o maior inóculo reconstituiu muito rápido, induzindo o aparecimento de GvHD precocemente (dados não mostrados). Assim definimos o inóculo de 5×10^6 células por animal como o mais adequado para a humanização dos camundongos NSG. Conforme discutido acima, a ocorrência do fenômeno de GvHD é uma complicação comumente presente após a humanização e potencialmente letal que precisa ser evitada nestes animais (ALI *et al.*, 2012). De acordo com dados da literatura, o desenvolvimento de GvHD, após reconstituição de animais imunossuprimidos com linfócitos humanos torna este modelo apenas adequado para estudos de doenças humanas com pequena janela terapêutica (entre 4 e 8 semanas) (BREHM *et al.* 2012, SKELTON *et al.*, 2018). Animais que desenvolvem GvHD apresentam sinais clínicos como erupção cutânea (AZEVEDO, 2010), perda de peso, eriçamento de pelos, arqueamento de dorso, diarreia, anemia, trombocitopenia, culminando em altos níveis de mortalidade (ALI *et al.* 2012, KING *et al.*, 2009). Como forma de evitar GvHD, pode-se eliminar a expressão de MHC I e II murinho nos camundongos, como feito em estudo conduzido por Brehm e colaboradores (2014). Neste estudo, os animais falharam em desenvolver a doença por ≤ 125 dias após o enxerto com PBMC's humanos.

Nossos resultados demonstram que conseguimos atingir o objetivo de humanização mínima de 40%, sem o desenvolvimento de GvHD em períodos precoces. De modo interessante, a humanização se mostrou ser dependente de doador. Sendo assim, analisamos as amostras dos doadores que apresentaram percentual médio de hCD45⁺ superior a 40% a partir do 14º dia após injeção, combinamos os dados e observamos, ao longo do tempo, um aumento de células hCD45 no sangue dos animais. Com 7 dias, nossos resultados demonstraram que a humanização ainda é baixa (cerca de 3%), aumentando com 14 dias. O maior aumento foi visto no dia 19 pós injeção de PBMC's, com cerca de 60% de humanização no período avaliado, período que variou entre os experimentos e foi dependente de doador. A cinética de humanização observada neste trabalho está em acordo com estudos anteriores, onde células imunes humanas circulantes foram detectadas em animais inoculados com PBMC's duas semanas após o enxerto (MORILLON *et al.* 2020). Neste trabalho, a avaliação clínica feita nos hu-camundongos indicou que a injeção de PBMC's não induziu perda de peso, morte, assim como os dados encontrados por Frias-Staheli *et al.* (2014), ou outras alterações clínicas, bem como nos parâmetros sanguíneos. No entanto, mesmo não havendo alterações nos parâmetros clínicos, a avaliação histológica demonstrou um recrutamento celular em amostras de fígados dos animais humanizados. Corroborando esse dado, a avaliação imunohistoquímica comprovou que esse acúmulo de células era, de fato, composto por células humanas, comprovando o sucesso da humanização.

Sabe-se que no modelo de hu-PBMC, as células T são a população predominante no sangue circulante, enquanto as células B são relativamente baixas (HARUI *et al.* 2011). Nossos resultados corroboram com os dados encontrados na literatura, demonstrando que camundongos NSG humanizados com PBMC's apresentaram praticamente 100% de células humanas expressando o marcador CD3 e não foram encontrados linfócitos B (BREHM *et al.* 2019, KIM *et al.* 2016). Semelhantemente, a análise de baço e fígado dos hu-camundongos demonstrou haver predomínio de células CD45⁺. De maneira interessante, a reconstituição de linfócitos B foi praticamente indetectável no sangue periférico nos diferentes tempos avaliados, bem como no fígado e no baço, conforme avaliado ao final do experimento. Monócitos e células dendríticas não foram identificados no sangue periférico dos hu-camundongos.

Uma vez estabelecido e caracterizado o modelo de hu-PBMC com boa janela terapêutica, nosso próximo objetivo foi comparar a infecção de animais NSG e hu-NSG com um vírus com alto tropismo por células humanas, o DENV.

A dengue é uma doença febril transmitida por mosquitos que infecta milhões de pessoas em todo o mundo e tem se destacado entre as enfermidades reemergentes, sendo considerada a

mais importante das doenças virais transmitidas por artrópodes, também conhecida como arbovirose (WHO, 2009). O tropismo do vírus da dengue por diferentes células humanas e a ausência de um modelo animal apropriado para o estudo dessa doença aumentam os desafios do estudo desse vírus, como por exemplo a identificação do risco de desenvolvimento de formas mais severas da doença e o desenvolvimento de terapias e fármacos direcionados à dengue (CUI *et al.* 2017, BOZZA *et al.* 2008, MOTA; RICO-HESSE, 2011). Por ser uma doença que não possui tratamento antiviral específico (BEGUM *et al.* 2019) ou vacina licenciada e os mecanismos envolvidos na imunidade protetora contra infecções pelo vírus ainda não serem totalmente entendidos, se faz necessário o estabelecimento de modelo animal que seja efetivo e mimetize mais fidedignamente os mecanismos envolvidos na doença para um potencial desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinais (GUZMAN *et al.* 2010).

A dengue está associada à trombocitopenia e outras características clínicas, com aumento de permeabilidade vascular e choque. Adicionalmente, hu-camundongos infectados pelo DENV-2 desenvolvem leucopenia transitória, trombocitopenia que pode perdurar por 4 semanas, danos hepáticos, viremia transitória em órgãos alvo (plasma, fígado e baço), produção de citocinas (INF γ , TNF). A presença de leucopenia transitória e trombocitopenia em hu-camundongos infectados por DENV sugere que a doença seja autolimitada ao modelo (CUI *et al.* 2017, FRIAS-STACHELI *et al.* 2014). Nestes trabalhos, a infecção de animais NSG e hu-NSG não resultou em redução na contagem de plaquetas ou hemoconcentração em relação aos respectivos grupos controle não infectados. Sabe-se que os animais NSG possuem poucas plaquetas circulantes em comparação a animais selvagens (JAISWAL *et al.* 2009), possivelmente pela mutação genética que portam e que pode alterar os seus progenitores de plaquetas. A contagem normal de um camundongo é no mínimo 800 mil plaquetas por 10³uL de sangue. Como no modelo de PBMC as células já são diferenciadas, não há progenitores de plaquetas, sendo esperado não observarmos queda de plaquetas humanas nos hu-camundongos infectados pelo DENV.

Na dengue, é comum ocorrer comprometimento de fígado, podendo levar à falência do órgão e alguns fatores parecem contribuir para essa disfunção, incluindo dano causado diretamente pelo vírus e respostas imunes causadas pela lesão (FERNANDO *et al.* 2016). Em estudo conduzido por CUI *et al.* (2017), camundongos humanizados com células progenitoras CD34⁺ provenientes de fígado fetal desenvolveram queda em níveis significativos de plaquetas humanas, monócitos/macrófagos e hepatócitos e a infecção pelo DENV nesses animais mimetizou características da doença assim como visto em humanos, como leucopenia, trombocitopenia e dano hepático, indicando que este modelo é sensível o suficiente para

reproduzir alterações como as vistas em humanos. Nossos resultados corroboram com os dados da literatura, demonstrando diminuição do número de monócitos após a infecção pelo DENV-2. Entretanto, houve um aumento do número de plaquetas, fato que pode ter ocorrido pela infecção de megacariócitos na medula.

Adicionalmente, em nosso modelo a partir de PBMC's humanos, a avaliação histopatológica não indicou presença de danos hepáticos após a infecção. A alteração observada no fígado foi um discreto aumento no infiltrado celular, indicando um possível processo inflamatório de natureza leve. Adicionalmente, a marcação das células com o anticorpo hCD45 indicou a presença de células humanas, inclusive dentro dos vasos sanguíneos, sugerindo sucesso na enxertia dos PBMC's nesses sítios.

Dessa forma, em seguida, buscamos avaliar se o dengue vírus seria capaz de infectar os linfócitos humanos e se esses linfócitos seriam responsivos à infecção, avaliando a presença da proteína não estrutura viral (NS3 viral), envolvida na replicação do vírus. Diversos estudos sugerem que o DENV pode infectar linfócitos (ST. JOHN; RATHORE, 2019). Outros estudos como o de Silveira *et al.* (2017), afirmam haver escassez de informações sobre interações entre linfócitos T e DENV durante o curso da doença. No entanto, esses mesmos pesquisadores investigaram a presença da proteína viral NS3 e demonstraram que células TCD4 e TCD8 humanas *naive* sustentam a replicação do vírus e são permissivas à infecção *in vitro*, indicando que essas células são susceptíveis à infecção. Em nosso estudo, a fim de avaliarmos a carga viral, inicialmente procedemos com um ensaio de titulação viral, o qual não teve sensibilidade o suficiente para detecção do vírus. Em seguida, investigamos a presença da proteína viral NS3 pelo método de citometria de fluxo e, da mesma forma, não observamos presença dessa proteína nos linfócitos T humanos dos Hu-PBMCs contrariando os dados obtidos por Silveira *et al.* (2017), onde afirmam que, tanto células TCD4 e TCD8 são infectadas por DENV em pacientes em fase aguda. Futuramente, o uso de metodologias mais sensíveis como PCR será usado.

Em seres humanos, a proporção de células expressando CD4 (~70%) é superior às células expressando CD8 (~30%) (CHAPLIN, 2010). No nosso modelo, a avaliação do fenótipo dos leucócitos humanos circulantes no sangue periférico dos animais NSG, demonstrou que a proporção era maior de células expressando CD4 com o pico dessa diferença ocorrendo no dia 14. No entanto, após a infecção pelo DENV-2, a melhor resposta de ativação de linfócitos encontrada foi de CD4, se mostrando mais funcional. Talvez o CD8 presente no PBMC injetado estivesse altamente proliferativo no animal, porém, expressando moléculas de exaustão e, após a proliferação inicial, se tornado anérgico e assim, não respondendo à infecção. Apesar de, no início, mostrarmos que o modelo estava enriquecido de CD8 em comparação ao sangue

humano, este modelo parece ser viável para CD4. No entanto, o perfil celular não foi caracterizado no início do experimento e, considerando esses achados, propomos caracterizar o perfil celular dos PBMC's antes da injeção. O trabalho com modelo humanizado é dificultado pela necessidade de anticorpos monoclonais que reajam somente com humano, pois o sistema é humano x murino. Alguns ensaios de ELISA foram feitos (dados não mostrados), porém esses ensaios não foram tão específicos para células humanas e sinais positivos para citocinas humanas foram encontrados em animais que não foram humanizados.

11. CONCLUSÃO

Sumarizando, no presente trabalho, demonstramos que: i) Por limitações éticas e técnicas (tempo gestacional e condições de coleta), o fígado fetal humano não foi uma boa fonte de obtenção de células progenitoras CD34⁺ viáveis, impossibilitando a posterior humanização dos animais NSG; ii) Bolsas de leucoaférese de doadores submetidos ao tratamento com GM-CSF são fontes satisfatórias de células tronco hematopoiéticas (CD34⁺), no entanto, nas condições avaliadas, a humanização de camundongos NSG com essas células não ocorreu, mesmo na presença de estimulação exógena por GM-CSF, sendo, portanto, necessários ajustes protocolares nas condições de enxertia de camundongos NSG a fim de se obter humanização satisfatória. iii) PBMC's humanos obtidos a partir de doadores saudáveis foram eficientes em induzir a humanização de camundongos NSG (Hu-PBMC's), os quais foram dependentes do doador e resultaram na enxertia majoritária de linfócitos T no sangue periférico e órgãos estudados (baço e fígado) em um percentual de humanização satisfatório (40-70% de células humanas), com enxertia ocorrendo dentro de uma janela de ~3-4 semanas, o que possibilitou o estudo de condições patológicas humanas sem, no entanto, induzir alterações clínicas deletérias nestes animais (eg: GvHD); iv) Neste contexto, a infecção pelo vírus da dengue (DENV), um patógeno cujo tropismo é exclusivo para células humanas, foi escolhido como objeto de estudo dos Hu-PBMC's; v) A infecção de Hu-PBMC's com o vírus da dengue não resultou em infecção e/ou ativação satisfatória dos linfócitos T humanos enxertados; vi) No entanto, uma pequena alteração no perfil de células do sangue periférico foi observada após a infecção.

Os resultados obtidos até este momento demonstram que a infecção de Hu-PBMC's com o DENV não foi efetiva em induzir infecção e/ou ativação importante dos linfócitos T humanos, bem como falhou em induzir aspectos clínicos associados à fisiopatologia da dengue.

De maneira geral, nós identificamos uma boa fonte de células tronco hematopoiéticas (CD34) derivadas de bolsa de leucoaférese a ser futuramente explorada na humanização de

camundongos da linhagem NSG. Ainda, estabelecemos um modelo onde a enxertia de PBMC's humanos foi eficaz em induzir a reconstituição de linfócitos T humanos no qual abre perspectivas para o estudo *in vivo* de condições clínicas humanas com significativa participação destes subtipos celulares na patogênese de doenças com tropismo majoritário por células humanas. Além disso, em estudos futuros, novos sítios de infecção podem ser mais explorados, como a medula, por ser um local importante para quimerização do animal, uma vez que o camundongo precisa continuar produzindo as células injetadas, assim como em linfonodos como demonstrado por Coelho-dos-Reis e colaboradores (2019) que encontraram frequência maior de células dendríticas nesses sítios do que em outros tecidos.

REFERÊNCIAS

AJLAN, B., A., ALAFIF, M. M., ALAWI, M. M., AKBAR, N. A., ALDIGS, E. K., MADANI, T. A. Assessment of the new World Health Organization's dengue classification for predicting severity of illness and level of healthcare required. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 13(8): e0007144. 2019.

AKKINA, R. New generation humanized mice for vírus research: Comparative aspects and future prospects. **Virology**. 435: 14-28, 2013.

ALI, N.; FLUTTER, B.; SANCHEZ-RODRIGUES, R.; SHARIF-PAGHALEH, E.; BARBER, L. D.; LOMBARDI, G.; NESTLE, F. O. Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2 γ ^{null} mice display a T-effector memory phenotype. **PLoS ONE**. 7(8): 1-10. 2012.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Vacina dengue: esclarecimentos. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/vacina-dengue-esclarecimentos>. Acesso em 23 de fevereiro de 2021.

AMALADOSS, A., CHEN, Q., LIU, M., DUMMLER, S. K., DAO, M., SURESH, S., CHEN, J., PREISER, P. R. De Novo generated human red blood cells in humanized mice support *Plasmodium falciparum* infection. **PLoS ONE**. 10(6):e0129825.2015.

ANDRÉ, M. C.; ERBACHER, A.; GILLE, C.; SHMAUKE, V.; GOECKE, B.; HOHBERGER, A.; MANG, P.; WILHELM, A.; MUELLER, I.; HERR, W.; LANG, P.; HANDGRETINGER, R.; HARTWIG, U. F. Long-term human CD34+ stem cell-engrafted Nonobese Diabetic/SCID/IL2 γ ^{null} mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells. **J Immunol**. 185(5): 2710-2720. 2010.

AZEVEDO, W. Doença enxerto versus hospedeiro aguda A-GVHD. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 32(1): 16-21. 2010.

BEGUM, F., DAS, S., MUKHERJEE, D., MAL, S., RAY, U. Insight into the tropismo of dengue virus in humans. **Viruses**. 11(12): 1136. 2019.

BENTE, D. A.; MELKUS, M. W.; GARCIA, V.; RICO-HESSE, R. Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. **Journal of Virology**. 79(21): 13797-13799. 2005.

BERNARD, C. **An Introduction to the Study of Experimental Medicine**. Dover Publications, INC. New York, 1957. 226p. disponível em: https://archive.org/stream/b21270557/b21270557_djvu.txt. Acesso em 15 de abril de 2020.

BILLERBECK, E., MOMMERSTEEG, M. C., SHLOMAI, A., XIAO, J. W., ANDRUS, L., BHATTA, A., VERCAUTEREN, K., MICHAILIDIS, E., DORNER, M., KRISHNAN, A., CHARLTON, M. R., CHIRIBOGA, L., RICE, C. M., DE JONG, Y. P. Humanized mice efficiently engrafted with fetal hepatoblasts and syngeneic immune cells develop human monocytes and NK cells. **J. Hepatol**. 65(2): 334-343. 2016.

BISCHUR, D. Trabalho com camundongos em pesquisa imunológica. Ligação, emoções e cuidado. **RECIIS – R. Eletr. De Com. Inf. Inov. Saúde**. 1(2): 29-37, 2008.

BOSMA, G. C., CUSTER, R. P., BOSMA, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. **Nature**, 301 (5900): 527-530. 1983.

BOZZA, F. A., CRUZ, O. G., ZAGNE, S. M. O., AZEREDO, E. L., NOGUEIRA, R. M. R., ASSIS, E. F., BOZZA, P. T., KUBELKA, C. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-I beta and INF-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infectious Diseases**. 8:86. 2008.

BRAINARD, D. M., SEUNG, E., FRAHM, N., CARIAPPA, A., BAILEY, C. C., HART, W. K., SHIN, H. S., BROOKS, S. F., KNIGHT, H. L., EICHBAUM, Q., YANG, Y. G., SYKES, M., WALKER, B. D., FREEMAN, G. J., PILLAI, S., WESTMORELAND, S. V., BRANDER, C., LUSTER, A. D., TAGER, A. M. Induction of robust cellular and humoral virus-specific adaptive immune responses in human immunodeficiency virus-infected humanized BLT mice. **Journal of Virology**. 83(14): 7305-7321. 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico 10: **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causadas por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 10, 2021**. 52. Disponível em https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf. Acesso em 10 de maio de 2021.

BREHM, M. A., BORTELL, R., VERMA, M., SHULTZ, L. D., GREINER, D. L. Humanized mice in translational immunology. In: **Translational Immunology**. 285-326. 2016.

BREHM, M. A., WILES, M. V., GREINER, D. L., SHULTZ, L. D. Generation of improved humanized mouse models for human infectious diseases. **J. Immunol Methods**. 0:3-17. 2014.

BREHM, M. A.; SHULTZ, L. D.; GREINER, D. L. Humanized mouse models to study human diseases. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**. 17: 120-125, 2010.

BROXMEYER, H. E.; DOUGLAS, G. W.; HANGOC, G.; COOPER, S.; BARD, J.; ENGLISH, D.; ARNY, M.; THOMAS, L.; BOYSE, E. A. Human cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 86: 3828-3832. 1989.

CAIMARI, A., OLIVER, P., KEIJER, J. PALOU, A. Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**. 14(2): 129-141. 2010.

CASTILLO, B., DASGUPTA, A., KLEIN, K., TINT, H., WAHED, A. Apheresis. In: **Transfusion Medicine for Pathologists: A Comprehensive Review for Board Preparation**. Elsevier. Cap. 6, p. 113-124. 2018.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 40(3): 289-299. 2004.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 125(2). 3-23. 2010.

CHEN, H. R., LAI, Y. C., YEH, T. M. Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. **Journal of Biomedical Science**. 25:58. 2018.

CHEN, Q. A., AMALADOSS, A.; YE, W.; LIU, M.; DUMMLER, S.; KONG, F.; WONG, L. H.; LOO, H. L.; LOH, E.; TAN, S. Q.; TAN, T. C.; CHANG, K. T. E.; DAO, M. SURESH, S.; PREISER, P. R.; CHEN, J. Human natural killer cells control *Plasmodium falciparum* infection by eliminating infected red blood cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 111:1479-1484, 2014.

CHEN, Q.; KHOURY, M.; CHEN, J. Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice. **PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 106(51): 21783-21788, 2009.

CLYDE, K, KYLE, J. L., HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J.Virol**. 80:11418-11431. 2006.

COELHO-DOS-REIS, J. G. A., FUNAKOSHI, R., HUANG, J., PEREIRA, F. V., IKETANI, S., TSUJI, M. Functional human CD141+ dendritic cells in human immun system mice. **J. Infect. Dis**. 221(2): 201-213. 2020.

COREY, S. J., MINDEN, M. D., BARBER, D. L., KANTARJIAN, H., WANG, J. C. Y., SCHIMMER, A. D. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nature Reviews Cancer**. 7(2): 118-129. 2007.

COSTA, V. V., FAGUNDES, C. T., SOUZA, D. G., TEIXEIRA, M. M. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection. **The American Journal of Pathology**. 182(6): 1950-1961. 2013.

COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T.; VALADÃO, D. F.; ÁVILA, T. V. CISALPINO, D.; ROCHA, R. F.; RIBEIRO, L. S.; ASCENÇÃO, F. R.; KANGUSSU, L. M.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; ASTIGARRAGA, R. G.; GOUVEIA, F. L.; SILVA, T. A.; BONAVENTURA, D.; SILVA, T. A.; DE ALMEIRA SAMPAIO, D.; LEITE, A. C. L.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, 231-250, 2014.

COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T.; VALADÃO, D. F.; CISALPINO, D.; DIAS, A. C. F.; SILVEIRA, K. D.; KANGUSSU, L. M.; ÁVILA, T. V.; BONFIM, M. R. Q.; BONAVENTURA, D.; SILVA, T. A.; SOUSA, L. P.; RACHID, M. A.; VIEIRA, L. Q.; MENEZES, G. B.; PAULA, A. M.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. A modelo of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- γ in host resistance to infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 6(5):e1663. 2012.

COSTA, V. V.; YE, W.; CHEN, Q.; TEIXEIRA, M. M.; PREISER, P.; OOI, E. E.; CHEN, J. Dengue virus-infected dendritic cells, but not monocytes, activate Natural Killer cells through a contact-dependent mechanism involving adhesion molecules. **MBio. Asm.Org**. 8(4): e00741-17. 2017.

- COVASSIN, L., JANGALWE, S., JOUVET, N., LANING, J., BURZENSKI, L., SHULTZ, L. D., BREHM, M. A. Human immune system development and survival of non-obese diabetic (NOD)-scid Il3^{rg^{null}} (NSG) mice engrafted with human thymus and autologous haematopoietic stem cells. **Clinical and Experimental Immunology**. 174: 372-388. 2013
- COX, J., MOTA, J., SUKUPOLVI-PETTY, S., DIAMOND, M. S., RICO-HESSE, R. Mosquito bite delivery of dengue virus enhances immunogenicity and pathogenesis in humanized mice. **Journal of Virology**. 86(14): 7637-7649. 2012.
- CRUZ-OLIVEIRA, C., FREIRE, J. M., CONCEIÇÃO, T. M., HIGA, L. M., CASTANHO, M. A. R. B., DA POIAN, A. T. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiol Rev**. 39(2): 155-170. 2015.
- CUI, L., HOU, J., FANG, J., LEE, Y. H., COSTA, V. V., WONG, L. H., CHEN, Q., OOI, E. E., TANNENBAUM, S. R., CHEN, J., ONG, C. N. Serum metabolomics investigation of humanized mouse model of dengue virus infection. **Journal of Virology**. 91(14): e00386-17. 2017.
- DANS, A. L., DANS, L. F., LANSANG, M. A. D., SILVESTRE, M. A. A., GUYATT, G. H. Controversy and debate on dengue vaccine series – paper 1: review of a licensed dengue vaccine: inappropriate subgroup analyses and selective reporting may cause harm in mass vaccination programs. **Journal of Clinical Epidemiology**. 95: 137-139. 2018.
- DAVIS, M. M. Immunology Taught by Humans. **Science Translational Medicine**. 4,117. 2012.
- DEEN, J., HARRIS, E., WILLS, B., BALMASEDA, A., HAMMOND S. N., ROCHA, C., DUNG, N. M., HUNG, N. T., HIEN, T. T., FARRAR, J. J. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **Lancet**. 368: 170-173. 2006.
- DOULATOV, S., NOTTA, F., LAURENTI, E., DICK, J. E. Hematopoiesis: a human perspective. **Cell Press**. 10(2): 120-136. 2012.
- DRAKE, A. C.; CHEN, Q.; CHEN, J. Engineering humanized mice for improved hematopoietic reconstitution. **Cellular & Molecular Immunology**. 9, 215–224, 2012.
- DUAN, K., ZHANG, B., ZHANG, W., ZHAO, Y., QU, Y., SUN, C., ZHAO, Y. Efficient peripheral construction of functional human regulatory CD4⁺Cd25^{high}Foxp3⁺ T cells in NOD/DCID mice grafted with fetal human thymus/liver and CD34⁺ cells. **Transplant Immunology**. 25. 173-179. 2011.
- EGEA, L, HIRATA, Y., KAGNOFF, M. F. GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**. 4(6): 723-731. 2010.
- EHX, G., SOMJA, J., WARNATZ, H. J., RITACCO, C., HANNON, M., DELENS, L., FRANSOLET, G., DELVENNE, P., MULLER, J., BEGUIN, Y., LEHRACH, H., BELLE, L., HUMBLET-BARON, S., BARON, F. Xenogeneic graft-versus-host-disease in humanized NSG and NSG-HLA-A2/HHD mice. **Front. Immunol**. 9: 1943. 2018.
- FAGUNDES, C. T., COSTA, V. V., CISALPINO, D., SOUZA, D. G., TEIXEIRA, M. M. Therapeutic opportunities in dengue infection. **Drug Devel. Res**. 72:480-500. 2011.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 19(1), 2004.

FERNANDO, S., WIJEWICKRAMA, A., GOMES, L., PUNCHIHEWA, C. T., MADUSANKA, S. D. P., DISSANAYAKE, H., JEEWANDARA, C., PEIRIS, H., OGG, G. S., MALAVIGE, G. N. Patterns and causes of liver involvement in acute dengue infection. **BMC Infectious Diseases**. 16: 319. 2016.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D., MAZZON, M., JACOBS, M., AMARA, A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. **Cell Host & Microbe**. 5(4): 318-328. 2009.

FERREIRA DE LIMA, V. H., LIMA-CAMARA, T. N. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. **Parasit Vectors**. 11(1): 77. 2018

FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina, Ribeirão Preto**. 32: 15-20. 1999.

FISCHL W, BARTENSCHLAGER R. Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. **Curr Opin Microbiol**. 2011;14(4):470-475.

FLANAGAN, S. P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. **Gent. Res. Camb**. 8. 295-309. 1966.

FOMIN, M. E., BEYER, A. I., MUENCH, M. O. Human fetal liver cultures support multiple cell lineages that can engraft immunodeficient mice. **Open Biol**. 7(12). 2017.

FRIAS-STAHOLI, N., DORNER, M., MARUKLAN, S., BILLERBECK, E., LABITT, R. N., RICE, C. M., PLOSS, A. Utility of humanized BLT mice for analysis of dengue virus infection and antiviral drug testing. **J Virol** 88:2205-2218. 2014.

GABRIEL, M., NAVARRO, G. S. C., BORBA, L., GAMARNIK, A. V., ESTRADA, L. C. Dengue virus capsid protein dynamics reveals spatially heterogeneous motion in live infected cells. **Nature Scientific Reports**. 10:8751. 2020.

GAO, S., LIU, F. Fetal liver: an ideal niche for hematopoietic stem cell expansion. **Science China Life Sciences**. 61. 2018.

GOLDIM, J. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em saúde e os direitos dos animais**. 2ed. Porto Alegre: HCPA. 1997.

GOLFIER, F., BARCENA, A., CRUZ, J., HARRISON, M. R., MUENCH, M. O. Mid-trimester fetal livers are a rich source of CD34^{+/++} cells for transplantation. **Bone Marrow Transplantation**. 24. 451-461. 1999.

GONZALES, L., STRBO, N., PODACK, E. R. Humanized mice: novel model for studying mechanisms of human immune-based therapies. **Immunol Res**. 57(0): 326-334. 2013.

GOULD, E., PETTERSSON, J., HIGGS, S., CHARREL, R., LAMBALLERIE, X. Emerging arboviroses: Why today? **One Health**. 4: 1-13. 2017.

GOUVEIA-MATOS, J. A. M. Pasteur. Química nova na escola. **Pasteur**. 6, 20-22. 1997.

GREINER, D. L., SHULTZ, L. D., YATES, J., APPEL, M. C., PERDRIZET, G., HESSELTON, R. M., SCHWEITZER, I., BEAMER, W. G., SHULTZ, K. L., PELSUE, S. C., LEIF, J. H., RAJAN, T. V. Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. **American Journal of Pathology**. 146(4): 888-902. 1995.

GROTTO, H. Z. W., NORONHA, J. F. A. Identificação de células tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional versus contador hematológico automatizado. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.** 25(3): 169-172. 2003.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**. 11(3): 480-496. 1998.

GUIMARÃES, M. V., FREIRE, J. E. C., L. M. B. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Rev. Bioet.** 24(2): 217-224. 2016.

GUNAWAN, M., HER, Z., LIU, M., TAN, S. Y., CHAN, X. Y., TAN, W. W. S., DHARMARAJA, S. FAN, Y., ONG, C. B., LOH, E., CHANG, K. T. E., TAN, T. C., CHAN, J. K. Y., CHEN, Q. A novel human systemic lupus erythematosus model in humanized mice. **Sci Rep**. 7:16642. 2017.

GUO, J. LI, Y., SHAN, Y., SHU, C., WANG, F., WANG, X., ZHENG, G., HE, J., HU, Z., YANG, Y. G. Humanized mice reveal an essential role for human hepatocytes in the development of the liver immune system. **Cell Death Dis**. 9(6): 667. 2018.

GUZMAN, M. G., HALSTEAD, S. B., ARTSOB, H., BUCHY, P., FARRAR, J., GUBLER, D. J., HUNSPERGER, E., KROEGER, A., MARGOLIS, H. S., MARTINEZ, E., NATHAN, M. B., PELEGRINO, J. L., SIMMONS, C., YOKSAN, S., PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**. 8(12): S7-S16. 2010.

HARUI, A., KIERTSCHER, S. M., ROTH, M. D. Reconstitution of huPBL-NSG mice with donor-matched dendritic cells enables antigen-specific t-cell activation. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**. 6, 148-157. 2011.

HAN, Q. R., LEE, J. E., LEE, M. J., KO, S. Y., SHIN, H. S., LEE, J. Y., LEE, D. R. Distinct repopulation activity in hu-mice between CB- and LPB- CD34+ cells by enrichment of transcription factors. **International Journal of Stem Cells**. 2021.

HENCHAL, E. A., PUTNAK, J. R. The dengue viroses. **Clinical Microbiology Reviews**. 3(4): 376-396. 1990.

HER, Z., YONG, K. S., PARAMASIVAM, K., TAN, W. W. S., CHAN, X. Y., TAN, S. Y., LIU, M., FAN, Y., LINN, Y. C., HUI, K. M., SURANA, U., CHEN, Q. An improved pre-clinical patient-derived liquid xenograft mouse model for acute myeloidleukemia. **J Hematol Oncol** 10:162. 2017.

HESSELTON, R. M., GREINER, D. L., MORDES, J. P., RAJAN, T. V., SULLIVAN, J. L., SHULTZ, L. D. High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice. **Journal of infectious diseases**. 172(4): 974-982. 1995.

HUEY, D. D., NIEWIESK, S. Production of humanized mice through stem cell transfer. **Current Protocols in Mouse Biology**. 8: 17-27. 2018.

IDREES, S., ASHFAQ, U. A. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. **Genetic Vaccines and Therapy**. 10:6. 2012.

IOC. Instituto Oswaldo Cruz. **Dengue: vírus e vetor**. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>. Acesso em 10 de março de 2021.

ITO, A., ISHIDA, T., YANO, H., INAGAKI, A., SUZUKI, S., SATO, F., TAKINO, H., MORI, F., RI, M., KUSUMOTO, S., KOMATSU, H., IIDA, S., INAGAKI, H., UEDA, R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potente ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-R γ null mouse model. **Cancer Immunol Immunother** 58:1195-1206. 2009.

ITO, M., KOBAYASHI, K., NAKAHATA, T. NOD/Shi-scid IL2 γ null (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 324, 53-76. 2008.

ITO, M.; HIRAMATSU, H.; KOBAYASHI, K.; SUZUE, K.; KAWAHATA, M.; HIOKI, K.; UEYAMA, Y., KOYANAGI, Y., SUGAMURA, K.; TSUJI, K.; HEIKE, T.; NAKAHATA, T. NOD/SCID/ γ_c ^{null} mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. **Blood**, 100 (9), 3175-3182, 2002.

IVANOVA, N. B., DIMOS, J. T., SCHANIEL, C., HACKNEY, J. A., MOORE, K. A., LEMISCHKA, I. R. A stem cell molecular signature. **Science**. 298, 601-604. 2002.

JAISWAL, S.; PEARSON, T.; FRIBERG, H.; SHULTZ, L. D.; GREINER, D. L.; ROTHMAN, A. L.; MATHEW, A. Dengue vírus infection and vírus-specific HLA-A2 restricted immune responses in humanized NOD-scid IL2 γ ^{null} mice. **PLoS One**. 4 (1): 1-12. 2009.

KATAOKA S., SATOH, J., FUJIYA, H., TOYOTA, T., SUZUKI, R., ITOH, K., KUMAGAI, K. Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse: abnormalities of cellular immunity. **Diabetes**. 32(3): 247-253. 1983.

KENG, C. T., CHING, W. S., ZHENG, D., ZHENG, Z., YONG, K. S. M., TAN, S. Q., ONG, J. J. Y., TAN, S. Y., LOH, E., UPADYA, M. H., KUICK, C. H., HOTTA, H., LIM, S. G., TAN, T. C., CHANG, K. T. E., HONG. W., CHEN, J., TAN, Y-J., CHEN, Q. Characterization of liver pathogenesis, human immune responses and drug testing in a humanized mouse model of HCV infection. **Gut** 65:1744-1753. 2015.

KIKUTANI, H., MAKINO, S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Advances in Immunology**. 285-322. 1992.

KIM, K. C., CHOI, B. S., KIM, K. C., PARK, K. H., LEE, H. J., CHO, Y. K., KIM, S. I., KIM, S. S., OH, Y. K., KIM, Y. B. A simple mouse model for the study of human immunodeficiency viru. **Aids research and Human Retroviruses**. 32(2): 194-202. 2016.

KING, M. A.; COVASSIN, L.; BREHM, M. A.; RACKI, W.; PEARSON, T. LEIF, J.; FODOR, W.; FOREMAN, O.; BURZENSKI, L.; CHASE, T. H.; GOTT. B.; ROSSINI, A. A.; BORTELL, R.; SHULTZ, L. D.; GREINER, D. L. Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene

mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. **Clin. Exp. Immunol.** 157(1): 104-118. 2009.

KING, M., PEARSON, T., SHULTZ, L. D., LEIF, J., BOTTINO, R., TRUCCO, M., ATKINSON, M. A., WASSERFALL, C., HEROLD, K. C., WOODLAND, R. T., SCHMIDT, M. R., WODA, B.A., THOMPSON, M. J., ROSSINI, A. A., GREINER, D. L. A new hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. **Clinical Immunology**, 126(3): 303-314. 2008.

KOOSHA, S., MOHAMED, Z., SINNIHAH, A., ALSHAWSH, M. A. Evaluation of anti-tumorigenic effects of diosmetin Against human colon cancer xenografts in athymic nude mice. **Molecules.** 24(14): 2522. 2019.

KOVAROVA, M.; BENHABBOUR, S. R.; MASSUD, I., SPAGNUOLO, R. A.; SKINNER, B. BAKER, C. E.; SYKES, C.; MOLLAN, K. R., KASHUBA, A. D. M., GARCÍA-LERMA, J. G., MUMPER, R. J., GARCIA, J. V. Ultra-long-acting removable drug delivery system for HIV treatment and prevention. **Nature Communications.** 9:4156. 2018.

KURANE, I.; MATSUTANI, T.; SUZUKI, R.; TAKASAKI, T.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. T-cell responses to dengue virus in humans. **Tropical Medicine and Health.** 39 (4): 45-51. 2011.

LAN, P.; TONOMURA, N.; SHIMIZU, A.; WANG, S.; YANG, Y. G. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and cd34+ cell transplantation. **Blood.** 108(2):487-492. 2006.

LEGRAND, N. PLOSS, A.; BALLING, R.; BECKER, P. D.; BORSOTTI, C.; BREZILLON, N.; DEBARRY, J.; DE JONG, Y.; DENG, H.; DI SANTO, J. P.; EISENBARTH, S.; EYNON, E.; FLAVELL, R. A.; GUZMAN, C. A.; HUNTINGTON, N. D.; KREMSDORF, D.; MANN, M. P.; MANZ, M. G.; MENTION, J. J.; OTT, M.; RATHINAM, C.; RICE, C. M.; RONGVAUX, A.; STEVENS, S.; SPITS, H.; STRICK-MARCHAND, H.; TAKIZAWA, H.; VAN LENT, A. U.; WANG, C.; WEIJER, K.; WILLINGER, T.; ZIEGLER, P. Humanized Mice for Modeling Human Infectious Disease: Challenges, Progress, and Outlook. **Cell Host & Microbe**, 6 (1), 5-9, 2009.

LEGRAND, N., WEIJER, K., SPITS, H. Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo. **J Immunol.** 176: 2053-2058. 2006.

LEPUS, C. M.; GIBSON, T. F.; GERBER, S. A.; KAWIKOVA, I.; SZCZEPANIK, M.; HOSSAIN, J.; ABLAMUNITS, V.; KIRKILES-SMITH, N.; HEROLD, K. C.; DONIS, R. O.; BOTHWELL, A. L.; POBER, J. S.; HARDING, M. J. Comparison of human fetal liver, umbilical cord blood, and adult blood hematopoietic stem cell engraftment in NOD-scid/ $\gamma c^{-/-}$, balb/c-Rag1 $^{-/-}$ $\gamma c^{-/-}$, and CB17-scid/bg immunodeficient mice. **Hum Immunol.** 70(10): 790-802. 2009

LESCAR, J., SOH, S., LEE, S. T., VASUDEVAN, S. G., KANG, C., LIM, S. P. The dengue virus replication complex: from RNA replication to protein-protein interactions to evasion of innate immunity. **Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies.** 115-129. 2018.

LI, Z., YANG, X., ZHANG, Y., YANG, X., CUI, X., ZHANG, Y., GONG, W., BAI, H., LIU, N., TANG, Z., GUO, M., LI, K., ZHANG, T., WANG, L., SONG, X. A human peripheral blood

mononuclear cell (PBMC) engrafted humanized xenograft model for translational immunology (I-O) research. **Journal of Visualized Experiments**. 150: e59679. 2019.

LOPES, N., NOZAWA, C., LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovirus emergentes no Brasil. **Rev. Pan. Amaz. Saúde**. 5(3): 55-64. 2014.

MAKINO, S., KUNIMOTO, K., MURAOKA, Y., MIZUSHIMA, Y., KATAGIRI, K., TOCHINO, Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Exp. Anim**. 29(1): 1-13. 1980.

MATTHIESSEN, L., LUCARONI, B., SACHEZ, E. Towards responsible animal research. **EMBO Reports**. 4(2): 104-107. 2003.

MCCUNE, J. M.; NAMIKAWA, R., KANESCHIMA, H. SHULTZ, L. D., LIEBERMAN, M.; WEISSMAN, I. L. The SCID-hu Mouse: Murine Model for the Analysis of Human Hematolymphoid Differentiation and Function. **Science**. 241(4873): 1632-1639. 1988.

MECKLENBURG, L., TYCHSEN, B., PAUS, R. Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. **Experimental Dermatology**. 14: 797-810. 2005.

MELKUS, M. W., ESTES, J. D., PADGETT-THOMAS, A., GATLIN, J., DENTON, P. W., OTHIENO, F. A., WEGE, A. K., HAASE, A. T., GARCIA, J. V. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. **Nature Medicine**. 12(11): 1316-1322. 2006.

MENDRONE JUNIOR, A. Sangue periférico como fonte de células para terapia celular. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. 31(1):19-24. 2009.

MERAZ, I. M., MAJIDI, M., MENG, F., SHAO, R. P., HA, M. J., NERI, S., FANG, B., LIN, S. H., TINKEY, P. T., SHPALL, E. J., MORRIS, J., ROTH, J. A. An improved patient-derived xenograft humanized mouse model for evaluation of lung cancer immune responses. **Cancer Immunology Research, canimm**. 0874.2018.

MESSINA, J. P., BRADY, O. J., SCOTT, T. W., ZOU, C., PIGOTT, D. M., DUDA, K. A., BHATT, S., KATZELNICK, L., HOWES, R. E., BATTLE, K. E., SIMMONS, C. P. HAY, S. I. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology**. 3(22): 138-146. 2014.

MILLIGAN, G. N., SARATHY, V. V., WHITE, M. M., GREENBERG, M. B., CAMPBELL, G. A., PYLES, R. B., BARRETT, A. D. T., BOURNE, N. A lethal model of disseminated dengue virus type 1 infection in AG129 mice. **J Gen Virol**. 98(10): 2507-2519. 2017.

MORILLON II, Y. M., SABZEVARI, A., SCHLOM, J., GREINER, J. W. The development of next-generation PBMC humanized mice for preclinical investigation of cancer immunotherapeutic agents. **Anticancer Research**. 40: 5329-5341. 2020

MORRISON, S. J., SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**. 505(7483): 327-334. 2014.

MOTA, J.; RICO-HESSE, R. Humanized mice show clinical signs of dengue fever according to infecting virus genotype. **Journal of Virology**. 83(17): 8638-8645. 2009.

NAGATANI, M., KODERA, T., SUZUKI, D., IGURA, S., FUKUNAGA, Y., KANEMITSU, H., NAKAMURA, D., MOCHIZUKI, M., KEMI, M., TAMURA, K., KASAHARA, K.

Comparison of biological features between severely immuno-deficient NOD/Shi-scid IL2rg^{null} and NOD/LtSz-scid IL2rg^{null} mice. **Exp. Anim.** 68(4): 471-482. 2019.

NAKAGAKI, B. N., MAFRA, K., CARVALHO, E., LOPES, M. E., CARVALHO-GONTIJO, R., OLIVEIRA, H. M. C., CAMPOLINA-SILVA, G. H., MIRANDA, C. D. M., ANTUNES, M. M., SILVA, A.C. C., DINIZ, A. B., ALVARENGA, D. M., LOPES, M. A. F., LACERDA, V. A. S., MATTOS, M. S., ARAÚJO, A. M., VIDIGAL, P. V. T., LIMA, C. X., MAHECHA, G. A. B., MADEIRA, M. F. M., FERNANDES, G. R., NOGUEIRA, R. F., MOREIRA, T. G., DAVID, B. A., REZENDE, R. M., MENEZES, G. B. Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **Journal of Hepatology.** 2018.

NARVAEZ, F., GUTIERREZ, G., PÉREZ, M. A., ELIZONDO, D., NUÑES, A., BALMASEDA, A., HARRIS, E. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** 5(11): e1397. 2011.

NASAR, S., RASHID, N., IFTIKHAR, S. Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: a review. **Journal of Medical Virology.** 1-15. 2019.

NAVARRO-SANCHEZ, E., ALTMAYER, R., AMARA, A., SCHWARTZ, O., FIESCHI, F., VIRELIZIER, J. L., AREZANA-SEISDEDOS, F., DESPRES, P. Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO Reports.** 4(7): 723-728. 2003.

NEUFELDT, C. J., CORTESE, M., ACOSTA, E. G., BARTENSCHLAGER, R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nat. Rev. Microbiol.** 16(3): 125-142. 2018.

NG, A., ALEXANDER, W. Haematopoietic stem cells: past, present and future. **Cell Death Discov.** 3, 17002. 2017.

NGONO, A. E., SHRESTA, S. Immune response to dengue and zika. **Annu. Rev. Immunol.** 36: 279-308. 2018.

NOTTA, F., DOULATOV, S., LAURENTI, E., POEPL, A., JURISICA, I., DICK, J. E. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. **Science.** 333(6039): 218-221. 2011.

PEARSON, T.; GREINER, D. L.; SHULTZ, L. D. Creation of “Humanized” Mice to Study Human Immunity. **Curr Protoc Immunol.** 81(1): 15.21.1-15.21.21. 2008.

PERERA, R.; KHALIQ, M., KUHN, R.J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. **National Institute of Health.** 80, 11–22. 2009.

QIAO, M. L., LUO, J.Y., YANG, M. H., WU, J. J., SHENG, P., YANG, M. H. Effect of *Ferula ferulaeoides* on growth and apoptosis of human gastric cancer MGC-803 transplantation tumor in nude mice. **Journal of Southern Medical University.** 39(7): 772-777. 2019.

REGIS, A. H. P., CORNELLI, G. Experimentação animal: panorama histórico e perspectivas. **Rev. Bioet.** 20(2): 232-243. 2012.

REIS, M. A. L., VISENTAINER, J. E. L. Reconstituição imunológica após o transplante de medula óssea alogênico. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 26(3): 212-217. 2004.

RONGVAUX, A., WILLINGER, T., MARTINEK, J. STROWING, T., GEARTY, S. V., TEICHMANN, L. L., SAITO, Y., MARCHES, F., HALENE, S., PALUCKA, A. K., MANS. M. G., FLAVELL, R. A. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. **Nature Biotechnology.** 32(4): 364-372. 2014.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat. Rev. Immunol.** 11:523-543. 2011.

RUSH, B. An account of the bilious remitting fever. **The American Journal of Medicine.** 11(5): 546-550. 1951.

SCHANAIDER, A., SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir Bras.** 19(4): 441-447. 2004.

SERTORIO, M., DU, W., AMARACHINTIHA, S., WILSON, A., PANG, Q. In vivo RNAi screen unveils PPAR γ as a regulator of hematopoietic stem cell homeostasis. **Stem Cell Reports.** 8, 1242-1255. 2017.

SHRESTA, S., SHARAR, K. L., PRIGOZHIN, D. M., BEATTY, P. R., HARRIS, E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. **J.Virol.** 80:10208-10217. 2006.

SHULTZ, L. D., LYONS, B. L., BURZENSKI, L. M., GOTT, B., CHEN, X., CHALEFF, S., KOTB, M., GILLIES, S. D., KING, M., MANGADA, J., GREINER, D. L., HANDGRETINGER, R. Human Lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz- *scid* IL2R γ^{null} mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. **J Immunol.** 174: 6477-6489.2005.

SHULTZ, L. D.; ISHIKAWA, F.; GREINER, D. L. Humanized mice in translational biomedical research. **Nature Reviews Immunology.** 7(2): 118-130. 2007.

SHULTZ, L. D.; SAITO, Y.; NAJIMA, Y.; TANAKA, S.; OCHI, T.; TOMIZAWA, M.; DOI, T.; SONE, A.; SUZUKI, N.; FUJIWARA, H.; YASUKAWA, M.; ISHIKAWA, F. Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2r γ^{null} humanized mice. **PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 107(29): 13022-13027, 2010.

SIDNEY, L. E., BRANCH, M. J., DUNPHY, S. E., DUA, H. S., HOPKINSON, A. Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. **Stem Cells.** 32: 1380-1389. 2014.

SILVEIRA, G. F., WOWK, P. F., CATANEO, A. H. D., DOS SANTOS, P. F., DELGOBO, M., STIMAMIGLIO, M. A., LO SARZI, M., THOMAZELLI, A. P. F. S., CONCHON-COSTA, I., PAVANELLI, W. R., ANTONELLI, L. R. V., BÁFICA, A., MANSUR, D. S., DOS SANTOS, C. N. D., BORDIGNON, J. Human T lymphocytes are permissive for dengue virus replication. **J Virol.** 92(10): e02181. 2018.

SIMMONS, C. P., McPHERSON, K., CHAU, N. V. V., TAM, D. T. H., YOUNG, P., MACKENZIE, J., WILLS, B. Recent advances in dengue pathogenesis and clinical management. **Vaccine**. 33(50): 7061-7068. 2015.

SKELTON, J. K.; ORTEGA-PRIETO, A. M. DORNER, M. A Hitchhiker's guide to humanized mice: new pathways to studying viral infections. **Immunology**. 154, 50-61. 2018.

SOUZA, D. G.; FAGUNDES, C. T.; SOUSA, L. P.; AMARAL, F. A.; SOUZA, R. S.; SOUZA, A. L.; KROON, E. G.; SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; BUKIN, E.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M. M. Essencial role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. **PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 106, 14138-14143. 2009.

SRIDHARAN, A.; CHEN, Q., TANG. K. F.; OOI, E. E.; HIBBERD, M. L.; CHEN, J. Inhibition of megakaryocyte development in the bone marrow underlies dengue virus-induced thrombocytopenia in humanized mice. **J. Virol**. 87(21):11648, 2013.

ST. JOHN, A. L., ABRAHAM, S. N., GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**. 11(6): 420-426. 2013.

ST. JOHN, A. L., RATHORE, A. P. S. Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. **Nature Reviews Immunology**. 19: 218-230. 2019.

STEPHENS, M. L.; GOLDBERG, A. M.; ROWAN, A. N. The first forty years of the alternatives approach: refining, reducing, and replacing the use of laboratory animals. In D.J. Salem & A.N. Rowan (Eds.), **The state of the animals**. 121-135. 2001.

SUMIDE, K., MATSUOKA, Y., KAWAMURA, H., NAKATSUKA, R., FUJIOKA, T., ASANO, H., TAKIHARA, Y., SONODA, Y. A revised road map for the commitment of human cord blood CD34-negative hematopoietic stem cells. **Nature Communications**. 9 (2202): 1-17. 2018.

SZADVARI, I., KRIZANOVA, O., BABULA, P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. **Physiol. Res**. 65(4): 441-453. 2016.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro. 18(3): 867-871. 2002.

TAUIL, P. L. O desafio do controle do *Aedes aegypti* e da assistência adequada ao dengue. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília. 16(3): 153-154. 2007.

THOMAS, T. K., SEAY J. H., ZHANG, C., OCHSENBAUER, J. C. KAPPES, J. C., GOLDSTEIN, H. High-Throughput Humanized Mouse Models for Evaluation of HIV-1 Therapeutics and Pathogenesis. **Methods in molecular biology** 1354:221-235. 2016.

TOBIN, L. M., HEALY, M. E., ENGLISH, K., MAHON, B. P. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4+ T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. **Clin. Exp. Immunol**. 172:333-348. 2013.

VILLGRAN, V., AGHA, M., RAPTIS, A., HOU, J. Z., FARAH, R., LIM, S. H., REDNER, R. L., IM, A., SEHGAL, A., DORRITIE, K. A., KISS, J. E., NORMOLLE, D., BOYIADZIS, M. Leukapheresis in patients newly diagnosed with acute myeloid leukemia. **Transfus Apher Sci**. 55(2): 216-220. 2016.

WALSH, N. C.; KENNEY, L. L.; JANGALWE, S.; ARYEE, K. E.; GREINER, D. L.; BREHM, M. A.; SHULTZ, L. D. Humanized models of clinical disease. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** 12: 187-215. 2017.

WANG, H.S.; HUNG, S. C.; PENG, S. T.; HUANG, C. C.; WEI, H. M.; GUO, Y. J.; FU, Y. S.; LAI, M. C.; CHEN, C. C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells.** 22(7): 1330-1337. 2008.

WANG, Z. N., WU, A., TEFAYE, A., FEINSTONE, S., KUMAR, A. HCV infection-associated hepatocellular carcinoma in humanized mice. **Infectious agents and cancer** 10:24.M. 2015.

WHITEHEAD, S. S., BLANEY, J. E., DURBIN, A. P., MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol.** 5(7): 518-528. 2007.

WHO. World Health Organization. Dengue and severe dengue. 2020. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em 30 de março de 2021.

WHO. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. New Edition Geneva: **World Health Organization.** 2009.

YAMAMOTO, R., MORITA, Y., OEHARA, J., HAMANAKA, S., ONODERA, M., RUDOLPH, K. L., EMA, H., NAKAUCHI, H. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. **Cell.** 154: 1112-1126. 2013.

YE, C., YANG, H., GENG, M., SHULTZ, L. D., GREINER, D. L., BREHM, M. A., KECK, J. G. A rapid, sensitive, and reproductible in vivo PBMC humanized murine model for deterring therapeutic-related cytokine release syndrome. **FASEB J.** 34(9): 12963-12975. 2020.

YOUNG, N. A., WU, L. C., BRUSS, M., KAFFENBERGER, B. H., HAMPTON, J., BOLON, B., JARJOUR, W. N. A chimeric human-mouse model of Sjögren's syndrome. **Clin. Immunol.** 156: 1-8. 2015.

ZANINI, F., ROBINSON, M., CROOTE, D., SAHOO, M. K., SANZ, A. M., ORTIZ-LASSO, E., ALBORNOZ, L. L., ROSSO, F., MONTOYA, J. G., GOO, L., PINSKY, B. A., QUAKE, S. R., EINAV, S. Virus-nmclusive single-cell RNA sequencing reveals the molecular signature of progression to severe dengue. **Proc Natl Acad Sci USA.** 115(52):e12369. 2018.

ZAYOUD, M., MALKI, K. E., FRAUENKNECHT, K., TRINSCHKE, B., KLOOS, L., KARRAM, K., WANKE, F., GEORGESCU, J., HARTWIG, U. F., SOMMER, C., JONULEIT, H., WAISMAN, A., KURSCHUS, F. C. Subclinical CNS inflammation as response to a myelin antigen in humanized mice. **Journal of Neuroimmune Pharmacology.** 8(4):1037-1047. 2013.

ZENG, D. Bridge between type 1 diabetes in mouse and man. **Proc Natl Acad Sci USA.** 114(41): 10821-10823. 2017.

ZHANG, B., DUAN, Z., ZHAO, Y. Mouse models with human immunity and their application in biomedical research. **J. Cell. Mol. Med.** 13(6): 1043-1058. 2009.

ZHAO, T., ZHANG, A. N., WESTENSKOW, P. D., TODOROVA, D., HU, Z., LIN, T., RONG, Z., KIM, J., HE, J., WANG, M., CLEGG, D. O., YANG, Y. G., ZHANG, K., FRIEDLANDER, M., XU, Y. Humanized mice reveal differential immunogenicity of cells derive from autologous induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**. 17: 353-359. 2015.