

Gustavo Portela Ferreira

TESE DE DOUTORADO

**VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS de *Dengue*
virus ISOLADAS DE PACIENTES EM
MODELO MURINO.**

**Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Belo Horizonte,
Fevereiro de 2008.**

Gustavo Portela Ferreira

**VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Dengue virus*
ISOLADAS DE PACIENTES EM MODELO
MURINO.**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (ênfase em Microbiologia).

Orientação: Prof^a Dr^a Erna Geessien Kroon

Co-orientação: Dr. Marco A. da Silva Campos

Belo Horizonte,
Fevereiro de 2008.

Dedico este trabalho aos meus pais que mesmo distante, fisicamente, sempre acompanharam meu caminho de perto. À minha querida companheira, amiga, mulher e noiva, Lina, que durante todos estes anos tão intensamente vividos mostrou-me as melhores atitudes de um ser humano.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Erna Geessien Kroon, pela a oportunidade de poder ter trabalhado no Laboratório de Vírus sob sua orientação e saber que além de uma grande pesquisadora, é também uma educadora que forma “gente” e preocupa-se com isso, pois essa é atribuição de um professor. Por estar sempre solícita em conversar e discutirmos os vários temas relacionados ao desenvolvimento desta tese, e ter sido crucial na minha formação acadêmica foi no mínimo um grande ganho, durante estes anos. Muito obrigado, Erna!

Ao Drº Marco Antônio da Silva Campos, co-orientador, que mesmo sem um contato freqüente esteve sempre presente no decorrer deste trabalho com sugestões pertinentes sobre os experimentos.

Ao Profº Dr. Cláudio Antônio Bonjardim pelo convívio amigável e de boas conversas (vinhos!), sobretudo, por seus ensinamentos e discussões sobre temas atuais da ciência.

Ao Profº Dr. Paulo César Peregrino Ferreira e a pesquisadora Jaqueline Germano pelo o convívio agradável e as sugestões e auxílios nos trabalhos.

Ao João Rodrigues (JONJON) que quando cheguei, sempre que lhe perguntava algo, ele respondia de forma firme - “não sei” - e eu não entendia o porquê. Agora eu sei que é porque ele sabe de “tudo muito” e sempre falando de suas teorias e hipóteses, que hoje muita delas nós todos confirmamos pelo exposto através da ciência. Valeu Jon!

À Hildinha (Saudades!) e por último a Andreza que mesmo nos bastidores são fundamentais para o bom funcionamento do laboratório e para as tarefas de todos que aqui estudam e trabalham. Tia Ângela, primeira pessoa do laboratório a conhecer, sempre que precisamos, encontramos nela disposição e paciência para ajudar a resolver os problemas cotidianos. Sem contar das conversas e de suas piadas!

A todos os colegas presentes e ausentes do Laboratório de Vírus pela a ajuda, colaboração e paciência de todos estes anos aqui com passaporte “estrangeiro”, Oh! lembrei, o Gabriel (valeu tio, boa sorte) e prosseguindo aos colegas do tão famoso

Lab. Vírus 4 (ambiente alegre, descontraído e, às vezes, um pouco mais!), ao maestro da turma e grande Bruno Quelé (sempre De férias), Marcelão, Brunin, Daniel (ausente da sala), Danilo, Jonska (agora, quetinho!), Tiago, Leandro, Braúlio, Ruiz e aos demais Graciela, Guilherme (valeu pela ajuda), Lu Bessa, Lu Garcia, a Flavinha “Conversada”, não precisa dizer, né! Drº Marcelo, Marieta, Ana Paula, Carla, Ana Celi, Gisele (Gi), Eliseuuu, Barbrinha, Leo Picareta! Léo e Bruno, Jaque, Jamas Crazy, Cíntia “Borrinha”, ou agora é doutora! E por fim não esquecer dos agregados André e a grande persona e gente finíssima Geraldão, o fenômeno! (Saudades do convívio!).

À Leandra, Leandrix ou ainda e simplesmente Lelê por ter tido a oportunidade de compartilhar a mesma área de trabalho e ter em você a confiança necessária de uma amiga, uma menina doce, amável e inteligente que certamente chegará a muitos New Yorks! New Yorks, no seu duradouro caminho científico com os DENV, é claro! Valeu Lelê (Saudades!!).

A Drª Giliane ou “Gigi” pela convivência e amizade de tantos anos e pelos primeiros passos que demos juntos nas imagens de AFM, antes da sua partida, e pelo exemplo profissional que você passa. Muito Obrigado, Gijas!

À todos os professores da Pós-Graduação, que contribuíram para minha formação acadêmica, gerando ensinamentos e dúvidas que a partir destas entendi e aprendi um pouco mais.

À secretária da Pós-Graduação que começou com a Cristina e agora com o tão procurado Douglas, ambos sempre muito cordiais ao atender e resolver o que havia pendente.

Ao Policarpo, que na parte final deste trabalho, esteve sempre disponível a ajudar nos CBAs.

Aos amigos e colaboradores de muitas imagens de AFM que fizemos juntos, caro José Mário Carneiro Vilela ou “Vilela”, Drª Maria Ivonete Silva e a Drª Margareth Spangler Andrade por ser sempre disponível e dar-me acesso ao Lab. de Nanoscopia, CETEC-MG.

À colaboradora e Profª Drª Rosa Maria Esteves Arantes pelo exemplo de postura e competência acadêmica e, ainda, a atenção e disponibilidade para as análises

histológicas, mesmo no final do ano em horários e datas onde muitos já estavam em férias.

Aos meus inestimáveis e verdadeiros amigos que consegui em terras mineiras, Filipes e Dani, que mesmo de longe (agora no Piauí!) torcem por mim e acreditam no meu trabalho. Ao exemplo de pesquisador que você é Felipe e ajuda certa, sempre!

À Juju, minha amiga, que conheci logo que chegamos ao Lab., da nossa convivência freqüente e das nossas conversas sobre o nosso querido Nordeste. Agora um pouco mais distante, em Giz de Fora, mas com a mesma alegria. Ao Zé Brenóides pelo apoio e amizade sempre com comentários poderados e ainda com seus conhecimentos cibernéticos sempre disponível para ajudar.

Ao amigo e Dr Anderson pela correção e competência profissional que você transmite quando conversa sobre temas científicos.

Á meu grandioso Amor, Lina, Linoca, não tenho como te agradecer em palavras eu precisaria de todos os adjetivos que traduzem felicidade, carinho, apreço, satisfação, admiração, gratidão, amizade, zelo... pois é cada um destes sentimentos que tenho por você, minha noiva! Diante de várias etapas das nossas vidas você sempre esteve de forma marcante e companheira me ajudando desde questões profissionais até em decisões importantes a serem tomadas. **Muito obrigado** minha querida noiva e futura mulher por estar presente e ser um presente na minha vida!

Aos meus queridos e eternos pais, Mimi e Dedé, e meu querido irmão Rômulo, eu tenho em vocês a segurança que preciso para continuar, diante de angústias e das aflições que temos, vocês mesmo longe parecem perto pela ajuda e o carinho dispensado por vocês, durante todos estes anos. Eu amo vocês demais, meus exemplos de família e união! Sem esquecer das queridas vovós (Yayá e Hilda) e vovôs (*In memoriam*) tios(as), primos(as) e aos amigos verdadeiros que torcem pelo sucesso.

Pai e Senhor, pela força e perseverança que tens me dado para continuar a caminhada sem pensar em fraquejar. Te louvo e agradeço!

Sumário

I – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Dengue virus.....	<u>2</u>
1.1.1 – O vírus.....	<u>2</u>
1.1.1.1 – Partícula viral, genoma e proteínas virais.....	2
1.1.1.2 – Visualização da partícula viral.....	9
1.1.1.3 – Ciclo de Multiplicação.....	10
1.1.1.4 – Ciclo de Transmissão.....	12
1.1.1.5 – Manifestações Clínicas.....	14
1.1.1.6 - Patogênese.....	15
1.2 – Resposta imune inata.....	18
1.3 - Resposta inata e Dengue virus.....	22
1.4 – Modelo animal.....	26
II - JUSTIFICATIVA	31
III – OBJETIVOS	34
3.1 - Objetivo Geral.....	35
3.2 – Objetivos Específicos.....	35
IV – MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 – Células.....	37
4.1.1 - C6/36.....	37
4.1.2 - LLC-MK2.....	37
4.2 – Vírus e amostras clínicas.....	37
4.2.1 – Multiplicação viral.....	38
4.2.2 - Titulação.....	39
4.2.2.1 - Determinação de unidades formadoras de placa – UFP.....	39
4.2.3 - Purificação do <i>Dengue virus</i> (Kuhn <i>et al.</i> , 2002).....	39
4.3 - Isolamento viral a partir de soros de pacientes (Figueiredo <i>et al.</i> , 2008).	40
4.4 – AFM.....	40
4.5 – Modelo murino.....	41
4.5.1 - Inoculação dos camundongos via intracerebral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica (I.D.) e subcutânea (S.C.).....	41
4.5.2 - Anestesia e processos de retirada de órgãos e soro.....	42
4.5.3 – Maceração e titulação dos órgãos.....	42
4.6 - Cytometric Bead Assay - CBA (BD).....	43
4.6.1 – Ensaio para detecção de citocinas no cérebro e soro de camundongos, por citometria de fluxo, inoculados com diferentes <i>Dengue virus</i>	43
4.7 – Histopatologia.....	44
4.8 – Quantificação do global de células brancas, leucócitos (WBC), no sangue total dos camundongos.....	44
4.9 – Análise estatística dos dados.....	45
V – RESULTADOS	46
5.1 – Multiplicação e titulações das amostras virais.....	47
5.2 – Visualização e análise ultraestrutural do Dengue virus, por Microscopia de Força Atômica (AFM).....	48

5.3 – Determinação da via de inoculação e susceptibilidade a infecção por Dengue virus em diferentes linhagens de camundongos.	54
5.4 - Virulência de amostras clínicas isoladas de pacientes com manifestações de febre clássica do dengue (FD) e febre hemorrágica do dengue (FHD).	58
5.4.1 – Virulência de diferentes sorotipos no modelo murino.	58
5.4.2 – Avaliação das alterações no sangue periférico do modelo murino.	65
5.4.3 – Cinética de infecção na análise do sangue periférico do modelo murino.	71
5.4.4 – Títulos de vírus nos órgãos dos camundongos: cinética de infecção	74
5.5 - Estudo comparativo da virulência de amostras de DENV-3 375(MG) genótipo I (Figueiredo et al., 2008) e Dengue virus 3 64(PI) genótipo III (segundo, Lanciotti et al., 1994) isolados de pacientes.	76
5.5.1 – Caracterização das amostras de DENV-3 64(PI) genótipo III e 375(MG) genótipo I.	76
5.5.1.1-Alinhamento de nucleotídeos e determinação das diferenças ..	76
5.5.2 – Diferenças de virulência das amostras na inoculação dos <i>Dengue virus</i> 3, no modelo murino.	78
5.5.3 – Resposta imune inflamatória no cérebro e soro de camundongos, após infecção intracraniana, com <i>Dengue virus</i> 3 de dois diferentes genótipos.....	87
5.5.4 – Variações de dose de <i>Dengue virus</i> 3 64(PI) genótipo III inoculados em camundongos.....	92
5.6 – Estudo da virulência da amostra Dengue virus 3 375 (MG) genótipo I (Figueiredo et al., 2008) em camundongos deficientes para genes relacionados à resposta imune inata.	98
5.6.1 – Susceptibilidade dos camundongos à inoculação do <i>Dengue virus</i> – 3 375(MG) I.	98
C57Bl/6.....	100
5.6.2 – Contagem de leucócitos no sangue periférico.	101
5.6.3 – Histopatologia do cérebro e pulmões de camundongos C57Bl/6 e IFN- γ -/-.	104
5.6.4 – Resposta de camundongos C57Bl/6 e deficientes para IFN- γ e TNFr p55 inoculados, via I.C., com 40 p.f.u. do <i>Dengue virus</i> 3 375(MG) genótipo I.	115
5.6.5 – Resposta imune no cérebro e soro de camundongos C57Bl/6, IFN- γ -/- e TNFr p55 -/-, após infecção intracraniana, com <i>Dengue virus</i> 3 375(MG) genótipo I.	119
VI – DISCUSSÃO.....	124
VII – CONCLUSÕES.....	138
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
IX – ANEXOS.....	158

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia e representação da estrutura da partícula do Dengue virus.	3
Figura 2: Representação da organização genômica do Dengue virus.	4
Figura 3: Ciclo de multiplicação do Dengue virus.	11
Figure 4: Imagens bidimensionais de AFM.	49
Figura 5: Medidas horizontais das partículas virais.	51
Figura 6: Imagens de altura, fase e zoom da partícula de Dengue virus.	52
Figura 7: Circularização do RNA de altura, fase, com zoom, imagem tridimensional (3D) e medida da espessura do RNA.	53
Figura 8: Sinais clínicos observados em camundongos BALB/c, com 2 semanas de idade, inoculados com $1,5 \times 10^4$ p.f.u., em um volume de 20 μ L, via I.C., com <i>Dengue virus 2</i>	55
Figura 9: Curva de sobrevivência de camundongos BALB/c e C57Bl/6, com 02 semanas de idade, infectados com <i>Dengue virus 2</i>	57
Figura 10: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6, com 2 e 5 semanas, infectados com o <i>Dengue virus 3 375(MG) I</i>	59
Figura 11: Virulência em camundongos C57Bl/6, com 5 semanas, infectados com 400 e 4000 p.f.u. do DENV-3 375(MG) I.	62
Figura 12: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6, com 6 semanas, infectados com diferentes amostras e sorotipos do <i>Dengue virus</i>	64
Figura 13: Contagem de leucócitos em camundongos C57Bl/6 inoculados, 6 semanas, com <i>Dengue virus 3</i>	67
Figura 14: Contagem de linfócitos em camundongos C57Bl/6, 6 semanas, inoculados com <i>Dengue virus 3</i>	69
Figura 15: Contagem de granulócitos em camundongos C57Bl/6, 6 semanas, inoculados com <i>Dengue virus 3</i>	70
Figura 16: Cinética de infecção em camundongos C57Bl/6 inoculados com <i>Dengue virus 3</i> ...	72
Figura 17: Cinética de infecção em camundongos C57Bl/6 inoculados com <i>Dengue virus 3</i> ...	73
Figura 18: Alinhamento de nucleotídeos, dos genes C e prM e da região 5' não-traduzida com 1182nt, das amostras Dengue virus 3 375(MG) genótipo I e Dengue virus 3 64(PI) genótipo III.	77
Figura 19: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6 adultos, com 6 semanas, infectados com duas amostras do Dengue virus 3 de diferentes genótipos.	79
Figura 20: Contagem de leucócitos totais em camundongos C57Bl/6 inoculados com amostras Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou 64(PI) genótipo III.	81
Figura 21: Contagem de linfócitos em camundongos C57Bl/6 inoculados com amostras Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou 64(PI) genótipo III.	82
Figura 22: Contagem de neutrófilos em camundongos C57Bl/6 inoculados com amostras Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou 64(PI) genótipo III. Camundongos C57Bl/6 foram	

inoculados com 4 x 10 ² p.f.u., em um volume de 20µL do Dengue virus 3 375(MG) I ou 64(PI) III, via I.C.	83
Figura 23: Histopatologia do cérebro de camundongos C57Bl/6 adultos inoculados com amostras do Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou 64(PI) genótipo III. Animais foram inoculados, via I.C., com 400 p.f.u., em volume de 20µL, e o espécime clínico foi coletado 8 dias p.i.	85
Figura 24: Resposta imune inflamatória em cérebros de camundongos infectados, via I.C., com o Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou com o Dengue virus 3 64(PI) genótipo III.	89
Figura 25: Resposta imune inflamatória no soro de camundongos infectados com o Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou com o Dengue virus 64(PI) genótipo III, via I.C..	91
Figura 26: Contagem de leucócitos totais de camundongos C57Bl/6 inoculados com doses crescentes da amostra Dengue virus 3 64(PI) genótipo III.	94
Figura 27: Contagem de linfócitos de camundongos C57Bl/6 inoculados com amostra Dengue virus 3 64(PI) genótipo III.	95
Figura 28: Histopatologia do cérebro de camundongos C57Bl/6 adultos controles e inoculados , por via I.C., com doses crescentes de Dengue virus 3 64(PI) genótipo III.	96
Figura 29: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6 e IFN- γ $-/-$, com 05 -09 semanas, infectados com Dengue virus 3 375 (MG) genótipo I.	99
Figura 30: Contagem de leucócitos em camundongos C57Bl/6 e IFN- γ inoculados com <i>Dengue virus 3</i>	102
Figura 31: Contagem de linfócitos em camundongos C57Bl/6 e IFN γ $-/-$ inoculados com <i>Dengue virus 3</i>	103
Figura 32: Histopatologia do cérebro de camundongos C57Bl/6 e IFN- γ $-/-$ infectados,	105
Figura 33: Histopatologia dos pulmões de camundongos C57Bl/6 e IFN- γ $-/-$ infectados,	106
Figura 34: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 $-/-$, com 9 semanas, infectados com Dengue virus 3 375(MG) I.	108
Figura 35: Contagem de leucócitos de camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 $-/-$ inoculados com Dengue virus 3 375(MG) I comparados aos controles.	111
Figura 36: Contagem de linfócitos de camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 $-/-$ inoculados com Dengue virus 3 375(MG) I comparados aos controles.	112
Figura 37: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6, iNOS $-/-$ e TNFr p55 $-/-$, com 07 semanas, infectados com Dengue virus 3 375 (MG) genótipo I.	114
Figura 38: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6, IFN- γ $-/-$, TNFr p55 $-/-$, com 06 - 08 semanas, infectados com o <i>Dengue virus 3 375(MG) genótipo I</i>	116
Figura 39: Histopatologia do cérebro de camundongos C57Bl/6 adultos controles e inoculados, via I.C., com 40 p.f.u., em volume de 20µL, com <i>Dengue virus 3 375(MG) genótipo I</i>	118
Figura 40: Resposta imune inflamatória no cérebro e soro de camundongos com o <i>Dengue virus 3 375(MG) genótipo I</i> , via I.C., entre o 8 ^o e 12 ^o dia p.i.	121
Figura 41: Resposta imune inflamatória no cérebro e soro de camundongos com o <i>Dengue virus 3 375(MG) genótipo I</i> , via I.C., entre o 8 ^o e 12 ^o dia p.i.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos genótipos do Dengue virus 1 estabelecidos por Rico-Hesse (1990)	7
Tabela 2 - Relação dos genótipos do Dengue virus 2 estabelecidos por Rico-Hesse (1990)	7
Tabela 3 - Relação dos genótipos do Dengue virus 3 estabelecidos por Lanciotti et al., (1994) .	8
Tabela 4 - Relação dos genótipos do Dengue virus 4 estabelecidos por Lanciotti et al., (1997) .	8
Tabela 5. Determinação dos títulos de vírus (p.f.u./mL) em órgãos de camundongos BALB-c e C57Bl/6, infectados, via I.C., com $1,5 \times 10^4$ p.f.u., em um volume de 20 μ L, do <i>Dengue virus 2</i>	56
Tabela 6. Eritrograma do sangue periférico de camundongos C57Bl/6 infectados, via I.C., com 4×10^2 p.f.u. do <i>Dengue virus 3 375(MG) I</i> e 25(MG) I.....	66
Tabela 7. Índices do sangue periférico de camundongos C57Bl/6 infectados, via I.C., com 4×10^2 p.f.u. do <i>Dengue virus 3 375(MG) I</i> e 25(MG) I.....	66
Tabela 8. Cinética de dosagem de vírus por título (p.f.u./mL), em camundongos C57Bl/6 infectados, via I.C., com <i>Dengue virus 3 375(MG) I</i> : determinação do título (p.f.u./mL) em órgãos.....	75
Tabela 9. Dosagem de vírus por título (p.f.u./ml) nos órgãos de camundongos C57Bl/6 infectados, via I.C., com <i>Dengue virus 3</i> no 8 ^o d.p.i., com as amostras DENV- 3 64(PI) III e 375(MG) I.	79
Tabela 10. Determinação dos títulos (p.f.u./mL) do vírus nos órgãos de camundongos C57Bl/6 e IFN- γ -/-, infectados, via I.C., com 4×10^2 p.f.u., em 20 μ L, do <i>Dengue virus 3 – 375(MG) I</i> ...	100
Tabela 11. Determinação dos títulos (p.f.u./mL) do vírus dos órgãos e soros de camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 -/- infectados, via I.C., com 4×10^2 p.f.u., em 20 μ L, do <i>Dengue virus 3 – 375(MG) I</i>	109

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a – aminoácidos

ADE - exacerbação da resposta imune humoral

AFM - Microscopia de Força Atômica

ALT - alanina aminotransferase

ANOVA – análise de variância

AST - aspartato aminotransferase

B.O.D.- demanda biológica de oxigênio

CD – células dendríticas

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular médio

COOH - grupamento carboxila

cm - centímetro

C.M.C. - carboximetilcelulose

CMV - citomegalovírus

dsRNA - ácido ribonucléico fita dupla

DNA - ácido desoxirribonucléico

DMEM - Meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

DENV- *Dengue virus*

ECP - efeito citopático

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EMCV – vírus da encefalomiocardite murina

FD - Febre do dengue

FHD- Febre hemorrágica do dengue

FCS - fluído cerebrospinal

HCM – hemoglobina corpuscular médio

HIV - vírus da imunodeficiência adquirida

HSV – vírus *Herpes simplex* humano

I.C.- intracerebral

ICTV - Comitê internacional para taxonomia de vírus

IL - Interleucina

I.P.- intraperitonal

I.V.- intravenoso

IFN - Interferon

iNOS – óxido nítrico sintetase indutível
IP-10 - proteína induzida por interferon gama-10(CXCL-10)
kb - quilobases
kDa - quilodaltons
L-15 - meio Leibowitz-15
LPS - Lipopolissacarídeos
LRR - repetições ricas leucina
LTA – Ácido lipotecóico
NGC – *Dengue virus 2* protótipo “New Guínea C”
NO – óxido nítrico
NOD - Domínio de oligomerização de nucleotídeos
NK – células matadoras naturais
MCP1 – proteína quimioatraente de monócito 1
MD-2 - Proteína sem região transmembrana necessária para o reconhecimento de PAMPs via TLR-4.
M.O.I. - Multiplicidade de infecção
MH - manifestações hemorrágicas
MV - vírus do sarampo
mL - mililitro
mM - milimolar
mm³ - milímetro cúbico
min - minutos
mRNA - ácido ribonucléico mensageiro
µg - micrograma
µL - microlitro
n.t - nucleotídeos
nm - nanômetros
NH₂ - grupamento amina
NK – células “natural killer”
NS - proteína não-estrutural
ORF - janela aberta de leitura
pb - pares de bases do DNA
p.i. - pós-infecção
pm - picômetros

PAMP - padrão molecular associado ao patógeno
PBMC - células mononucleares do sangue periférico
PBS - solução salina fosfatada
PCR - reação em cadeia da polimerase
PE - ficoeritrina
PEG - polietilenoglicol
PFU - unidade formadora de placa
PRR - receptor de reconhecimento padrão
RNA - ácido ribonucléico
r.p.m. - rotações por minuto
RpRD – RNA polimerase dependente de RNA
RANTES - Proteína secretada, expressa em linfócitos T normais e regulada após ativação
RSV - vírus respiratório sincicial
ssRNA - ácido ribonucléico fita simples
SCID - imunodeficiência severa combinada
SCD - Síndrome do choque do dengue
SFB - soro fetal bovino
SNC - sistema nervoso central
TCID₅₀ – dose infectante para destruir 50% da cultura de tecido
Th - Referente ao tipo de resposta imune
TES - Tris EDTA Sódio
TLR – receptores tipo “Toll”
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
UTR - região não traduzida
VCM- volume corpuscular médio
WBC – células brancas totais
°C - graus Celsius
% - porcentagem

Resumo

O *Dengue virus* (DENV) é um membro do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, que compreende vírus envelopados e RNA senso positivo. A dengue é a doença viral transmitida por mosquitos de maior prevalência em humanos. É causada por um ou mais dos quatro sorotipos virais (DENV-1 a DENV-4). DENV causa um espectro de doenças em humanos, a infecção ocorre desde uma manifestação assintomática a uma febre súbita (FD), até uma febre hemorrágica (FHD) ou, ainda, o envolvimento mais freqüente do SNC. Inicialmente, com DENV purificado foi visualizado por AFM o RNA viral extruído em conformações linear e circular e determinado o diâmetro (55nm) da partícula. Vários modelos murino têm sido descrito para infecção com o DENV, contudo nenhum recria um quadro de doença similar à ocorrida em humanos. Para avaliar a virulência de amostras isoladas de pacientes com FD e FHD, inoculamos com dose de 4×10^2 p.f.u. pelas vias i.p., i.v., i.d., s.c., e i.c., camundongos C57B/6 de 2 a 8 semanas com DENV-1 e DENV-3. Foram observados sinais clínicos, mortalidade, leucopenia e título viral em camundongos inoculados, via i.c., com os DENV-3 25(MG) e 375(MG) genótipos I comparado aos controles, ao passo que, os animais com os DENV-1 e o DENV-3 64(PI) genótipo III não apresentaram sinais clínicos e mortalidade. Neste trabalho foram inoculados, via i.c., com DENV-3 375(MG) I camundongos deficientes para IFN- γ , TNF α e iNOS genes da resposta imune inata e foi detectado no cérebro e/ou soro o título viral, alterações sanguíneas (leucopenia), histopatológicas (meningoencefalite) e níveis aumentados de citocinas que caracterizam um processo inflamatório. Foi feito um comparativo entre os DENV-3 64(PI) III e DENV-3 375(MG) I e os animais inoculados com este último vírus apresentaram um quadro clínico que demonstra um comprometimento difuso e agudo do SNC mostrando diferenças, já descritas, em comparação com animais DENV-3 64(PI) III, inclusive com alterações genômicas.

I – INTRODUÇÃO

1.1 – *Dengue virus*

1.1.1 – O vírus

O *Dengue virus* (DENV) é o agente etiológico da infecção viral transmitida por mosquitos mais prevalente em humanos (Deen *et al.*, 2006). O vírus pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* de acordo com ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) 2005.

O gênero *Flavivirus* é composto por mais de 70 vírus, muitos dos quais causadores de doenças humanas, incluindo *Dengue virus*, *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV), *Yellow fever virus* (YFV) e outros com caráter mais endêmico ou regional como: *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV), *St. Louis encephalitis virus* (SLEV) e *Murray Valley encephalitis virus* (MVEV). Os membros deste gênero podem ser subdivididos em sorocomplexos de acordo com grupos antigênicos ou agrupados em espécies através de critérios baseados na sorologia clássica e na filogenia molecular (revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Lindenbach *et al.*, 2007).

Os *Flavivirus* são transmitidos por artrópodes e os sintomas da infecção podem variar desde uma febre branda, uma encefalite fatal até uma febre hemorrágica (Burke & Monath, 2001 revisado por Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

O DENV compreende quatro sorotipos: DENV 1, 2, 3 e 4. Estes vírus são epidemiologicamente similares, contudo são genética e antigenicamente distintos. A infecção com um dos sorotipos confere imunidade prolongada contra uma reinfecção homóloga, porém uma curta proteção contra um vírus heterólogo (Wang *et al.*, 2000).

1.1.1.1 – Partícula viral, genoma e proteínas virais

Os vírus do gênero *Flavivirus* são pequenos e esféricos com tamanho em torno de 50nm, relativamente, sem espículas – macio - no vírus maduro (Kuhn *et al.*, 2002) e apresentam simetria icosaédrica. Partículas imaturas de DENV-2 e YFV são em torno de 60nm maiores que partículas maduras (Zhang *et al.*, 2003). A estrutura destes vírus é composta pelo genoma, envolvido por proteínas do cerne eletrondenso de 30nm e por um envelope de natureza lipídica. Os vírus são compostos de 6% de RNA, 66% de proteínas, 9% de carboidratos e 17% de lipídios. Microscopia crioeletrônica e a reconstrução de imagens mostram com detalhes, informações sobre a estrutura dos flavivirus e do DENV (Zhang *et al.*, 2003; Lindenbach & Rice, 2001; Lindenbach *et al.*, 2007) (figura 1).

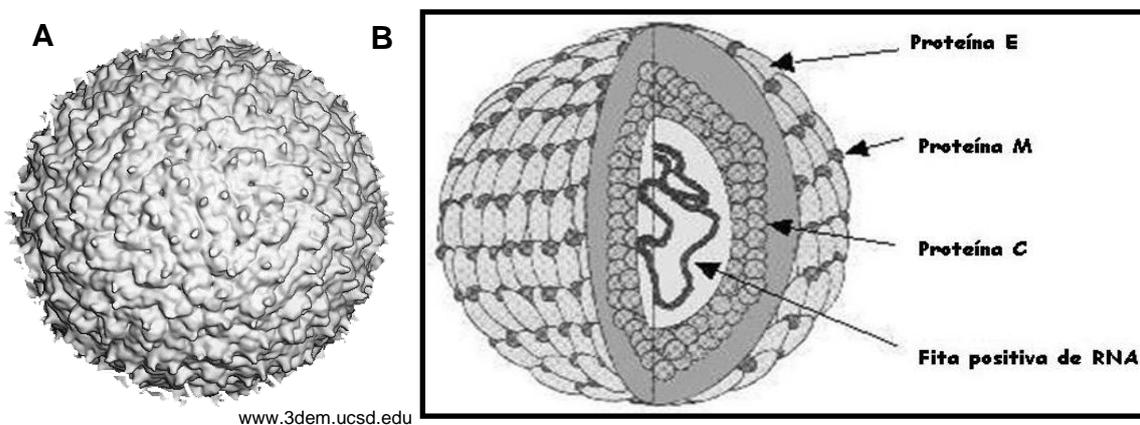


Figura 1: Morfologia e representação da estrutura da partícula do *Dengue virus*. (A) - *Dengue virus* visualizado por microscopia crioeletrônica através da reconstrução de imagens da partícula (Purdue University). (B) - Representação esquemática do DENV, indicando a localização das proteínas estruturais e genoma viral (Rice, 1996).

O genoma do vírus é formado de RNA fita simples, polaridade positiva e com 10,8 kb possui uma única janela aberta de leitura (ORF). O RNA genômico codifica uma poliproteína que é processada co- e pós-traducionalmente por proteases virais e da célula hospedeira, com 3400 aminoácidos (aa), codificando para dez proteínas: três proteínas estruturais -

capsídeo, membrana (M a qual é expressa como prM, precursora de M) e envelope (E) – constituintes da partícula viral. Sete proteínas não-estruturais (NS) que são essenciais para replicação do vírus. O genoma que codifica esta única ORF é flanqueado por duas regiões não traduzidas (5' e 3'UTR). (Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach & Rice, 2001 revisado por Mackenzie *et al.*, 2004; Lindenbach *et al.*, 2007).

A ordem das proteínas codificadas na janela aberta de leitura é **5'(NH₂) - C - prM (M) - E - NS1 - NS2a - NS2b - NS3 - NS4a - NS4b - NS5 - 3'(COOH)** (figura 2). A região não-traduzida 5'UTR (N-terminal) é formada por, aproximadamente, 100 nucleotídeos (nt) e apresenta um cap ($m^7G5'ppp5'A$) tipo I, enquanto que a região 3'UTR (C-terminal) é formada por 400-700 nt e não possui a cauda de poliadenina, característica que define a família *Flaviviridae*. As três proteínas estruturais virais que se encontram na região amino-terminal da ORF, na extremidade 5', do genoma viral; são: C, proteína do nucleocapsídeo ou do cerne com 11 kDa; M, proteína de membrana-associada ao envelope através de âncoras hidrofóbicas inseridas na camada bilipídica de 8 kDa e a proteína de envelope E, de 53 kDa (Lindenbach & Rice, 2001; Lindenbach *et al.*, 2007).

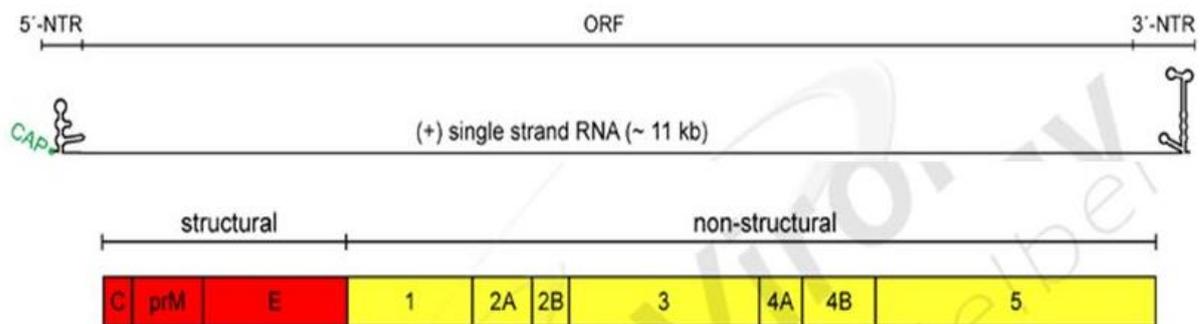


Figura 2: Representação da organização genômica do *Dengue virus*. Genoma desenhado a partir da única ORF para síntese da poliproteína, originando as dez proteínas componentes da partícula viral (Molecular Virology University Heildeberg).

A proteína C que envolve o genoma viral, forma um complexo, originando o nucleocapsídeo viral. A proteína é de 120 aminoácidos (aa) e possui as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas de aa conservados

apresentando caráter básico. A porção central da proteína interage com membrana celular e desempenha um papel na montagem do vírus (Lindenbach & Rice, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

A proteína prM, 26 kDa, é uma precursora glicosilada da proteína estrutural M (8 kDa). A prM de 165 aa é clivada para formar a proteína M de ~ 75 aa e o segmento “pr” N-terminal. Esta clivagem está relacionada com a maturação ou liberação do vírus, pois prM e M são, principalmente, encontradas nos vírus intracelulares e extracelulares, respectivamente. O segmento N-terminal de prM é, predominantemente, hidrofílico e contém de 1 a 3 sítios de glicosilação e 6 resíduos de cisteína conservados que formam as pontes dissulfeto. A proteína M localiza-se na porção C-terminal de prM, e está presente nos vírus. Contém um domínio extracelular formado de 41 aa, seguido por dois domínios transmembrana. Esta proteína parece funcionar como uma chaperonina na montagem e conformação da proteína E (Lindenbach & Rice, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Clyde *et al.*, 2006).

A proteína E é a principal proteína de superfície viral com 495 aa, além de conter sítios de ligação ao receptor celular e peptídeos de fusão à membrana celular. É uma proteína de membrana tipo I que contém domínios transmembrana na porção C-terminal da proteína. Estes domínios servem para ancorar a proteína na membrana e como uma seqüência sinal para translocação de NS1. Esta proteína parece desempenhar papéis importantes em várias etapas do ciclo de multiplicação, incluindo montagem, hemaglutinação de eritrócitos, sendo o alvo principal de anticorpos neutralizantes. Esta glicoproteína é também o principal alvo da imunidade humoral e contém três domínios (I, II e III) com funções de dimerização, peptídeos de fusão e atividade de ligação ao receptor da célula hospedeira. A glicosilação difere de acordo com o sorotipo e célula onde o vírus foi multiplicado. Esta proteína é o principal alvo da imunidade humoral (Lindenbach & Rice, 2001; Clyde *et al.*, 2006; Lindenbach *et al.*, 2007).

As proteínas não-estruturais NS1 - NS2a - NS2b - NS3 - NS4a - NS4b - NS5 estão codificadas em 75% da ORF (figura 2). Entre as regiões altamente conservadas de NS1, NS3 e NS5, são encontradas regiões hidrofóbicas menos conservadas que dão origem a quatro proteínas não estruturais NS2a - NS2b - NS4a - NS4b (Lindenbach & Rice, 2001).

A proteína não-estrutural 1 (NS1), com ~ 46 kDa, é uma glicoproteína que pode ser encontrada no meio intracelular, associada à membrana da célula ou no meio extracelular. É uma proteína secretada em células de mamíferos, e não em células de mosquito, e parece estar envolvida em processos de replicação do RNA. NS1 é translocada para dentro do lúmen do retículo endoplasmático, por uma sequência hidrofóbica, codificada pela região C-terminal da proteína E (Lindenbach & Rice, 2001). Esta proteína também tem papel na virulência, tornando o vírus menos infectivo (menor produção) quando ocorrem mutações de sítios na região N-terminal do genoma. Infecções naturais com os vírus do gênero *Flavivirus* induzem a formação de anticorpos anti-NS1 com atividade de fixação de complemento, e as formas secretadas desta proteína têm sido denominadas antígenos solúveis de fixação do complemento (Jacobs *et al.*, 2000; Lindenbach & Rice, 2001; Lindenbach *et al.*, 2007).

As proteínas NS2A e NS2B são relativamente pequenas com 22kDa e 14kDa, respectivamente, são proteínas hidrofóbicas com funções na replicação. A proteína NS2A esta envolvida na montagem da partícula, e NS2B forma um complexo estável com NS3 e esta age como um co-fator para NS2B (Lindenbach & Rice, 2001; Lindenbach *et al.*, 2007).

A proteína NS3, a segunda maior proteína viral, com ~ 70 kDa é altamente conservada entre os vírus do gênero *Flavivirus*. Esta proteína tem várias funções como a de protease, helicase e RNA trifosfatase que estão relacionadas ao processamento da poliproteína e a replicação do RNA (Lindenbach & Rice, 2001). É uma proteína citoplasmática que está

associada à membrana por interações com domínios hidrofóbicos da proteína NS2B (Lindenbach & Rice, 2001).

NS4A (16kDa) e NS4B (27kDa) são proteínas pequenas e hidrofóbicas que estão associadas à membrana. Com base em interação entre NS1 e NS4A, esta parece atuar na replicação do RNA, conforme colocalização desta proteína em complexos de replicação assim como também NS4B colocaliza-se com NS3 em prováveis sítios de replicação do RNA (Lindenbach & Rice, 2001; Lindenbach *et al.*, 2007).

NS5 é a última proteína codificada na ORF, a maior com 103 kDa e a proteína mais conservada dos vírus do gênero *Flavivirus*. NS5 é uma proteína básica multifuncional que não possui porção hidrofóbica e tem função de RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) e metiltransferase (MTase). O domínio N-terminal está envolvido na metilação para a formação do “cap” na extremidade 5’ do RNA. A porção C-terminal da proteína contém alta homologia de RdRP com outros vírus RNA senso positivo (Lindenbach & Rice, 2001; Lindenbach *et al.*, 2007). A atividade de polimerase foi comprovada com a produção da proteína NS5 do *Dengue virus 1* recombinante em *Escherichia coli* (Johansson *et al.*, 2001).

Análises filogenéticas de seqüências de 240 nt da região de junção da proteína E com a proteína NS1 (E/NS1) de diferentes amostras de *Dengue virus* classificaram-se, pelo menos, cinco genótipos para *Dengue virus 1* e para *Dengue virus 2* (Rico-Hesse *et al.*, 1990) (tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Relação dos genótipos do *Dengue virus 1* estabelecidos por Rico-Hesse (1990)

Genótipos	Distribuição geográfica
I	América, África, e sudeste Asiático
II	Sri-Lanka
III	grupo japonês
IV	Sudeste Asiático, Pacífico Sul, México e Austrália
V	Taiwan e Tailândia

Foram analisadas 40 amostras isoladas entre 1943 e 1988 de diferentes países.

Tabela 2 - Relação dos genótipos do *Dengue virus 2* estabelecidos por Rico-Hesse (1990)

Genótipos	Distribuição geográfica
I	Caribe e Pacífico Sul
II	Taiwan, Filipinas, Nova Guiné, Tailândia (1964)
III	Vietnã, Jamaica, Tailândia
IV	Indonésia, República de Seicheles, Burquina Faso, Sri Lanka
V	África rural

Foram analisadas 40 amostras isoladas entre 1944 e 1988 de diferentes países.

O DENV-3 tem sido classificado em quatro genótipos pelo seqüenciamento dos genes de envelope de 23 amostras distintas, geograficamente, segundo Lanciotti *et al.*, (1994) (tabela 3). O *Dengue virus 4* foi classificado em dois genótipos, baseado na seqüência da proteína E, segundo Lanciotti e colaboradores, (1997) (tabela 4).

Tabela 3 - Relação dos genótipos do *Dengue virus 3* estabelecidos por Lanciotti *et al.*, (1994)

Genótipos	Distribuição geográfica
I	Indonésia, Malásia, Filipinas e Ilhas do Sul do Pacífico
II	Tailândia
III	Sri-Lanka, Índia, África e Samoa
IV	Puerto Rico

Foram analisadas 23 amostras isoladas entre 1956 e 1989 de diferentes países.

Tabela 4 - Relação dos genótipos do *Dengue virus* 4 estabelecidos por Lanciotti *et al.*, (1997)

Genótipos	Distribuição geográfica
I	Filipinas, Tailândia e Sri- Lanka
II	Indonésia, Tahiti, Ilhas do Caribe e da América Central e do Sul

Foram analisadas 19 amostras isoladas entre 1963 e 1985 de diferentes países.

Estudos epidemiológicos indicam que determinadas amostras de *Dengue virus* são mais virulentas que outras. Por exemplo, genótipos de febre do dengue endêmico da América Central e do Sul estão relacionados com doença moderada, enquanto genótipos da Ásia introduzidos nas América têm sido responsáveis por epidemias de FHD (Messer *et al.*, 2003). Mais recentemente Figueiredo e colaboradores (2008) mostram através de seqüências de nucleotídeos, de amostras isoladas em Minas Gerais, nas regiões da junção dos genes C-prM (504 nt) e no gene E, mais variável, (1023 nt) agruparam-se como *Dengue virus* 3 genótipo I (Asiático). Assim, este é o primeiro relato na América do Sul do DENV-3 genótipo I.

1.1.1.2 – Visualização da partícula viral

A visualização da organização de superfícies microbianas e o grande desenvolvimento, nos últimos 30 anos, da técnica de microscopia crioelétrica foram fundamentais em imagens de alta resolução das estruturas de superfícies celulares. Contudo, esta metodologia sofisticada é trabalhosa e necessita de vários equipamentos, e não é capaz de examinar estruturas biológicas em condições nativas nas soluções aquosas (Dufrêne, 2004).

A microscopia de força atômica (AFM) descrita em meados dos anos 80 (Binnig *et al.*, 1986) proporcionou a possibilidade de visualização e manipulação de biosuperfícies em estado fisiológico. A técnica é um membro da família de novas técnicas de microscopia que são conhecidas como “scanning-probe microscopy” (SPMs). A AFM é amplamente utilizada em

vários campos da ciência como biologia, física em estado sólido e ciência de materiais gerando imagens por uma força em escalas nanométrica até picométrica (10^{-12} N) (Kienberger et al., 2006; Hinterdorfer & Dufrêne, 2006). Por AFM, pode ser obtidas imagens tridimensionais (3D) onde são visualizadas amostras vivas em pequena resolução e com o mínimo de preparação (Engel & Muller 2000). Esta técnica tem sido aplicada no estudo dos vírus, em imagens de topografia mostrando a interação vírus-célula (Lee & Ng 2004), como a observação de amostras purificadas incluindo o vírus do mosaico do tabaco, poxvirus e o vírus da imunodeficiência humana, assim podendo revelar defeitos e modificações estruturais de partículas virais individuais (Drygin *et al.*, 1998; Malkin *et al.*, 2003; Kuznetsov *et al.*, 2003).

Utilizando AFM, foi mostrado a circularização do genoma do *Dengue virus* através de interações RNA-RNA na ausência de proteínas. Foram visualizadas moléculas de RNA do dengue individualizadas em conformação circular e foi descrito as seqüências de ciclização (CS) das regiões finais 5' e 3' UTR são implicadas como essenciais, mas não suficiente para que a interação destas regiões ocorram (Alvarez *et al.*, 2005). Assim, AFM tem se tornado uma técnica adicional poderosa disponível para investigar estruturas, propriedades e função de superfícies microbianas em estado nativo e deveria ser utilizada por químicos, biofísicos, biólogos celulares e microbiologistas (Dufrêne, 2004).

1.1.1.3 – Ciclo de Multiplicação

O ciclo do DENV inicia quando o vírus infecta uma célula hospedeira permissiva. O DENV *in vitro* é capaz de infectar várias células humanas incluindo células dendríticas (DC), monócitos/macrófagos, células B e T, células endoteliais, hepatócitos, células neuronais (Clyde *et al.*, 2006). A penetração do *Dengue virus* em células hospedeiras ocorre após a ligação da proteína E a um ou mais receptores de superfície celular (figura 3 -1). Os receptores de superfície celular DC-SIGN (dendritic-cell-specific ICAM-

grabbing non-integrin) que interagem com resíduos de carboidratos da proteína E, as proteínas reguladas por glicose (GRP78/BiP) e moléculas associadas a CD-14 são candidatos à receptores primários para o DENV (Chen *et al.*, 1997; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Após ligação ao receptor ocorre a penetração na célula hospedeira por endocitose mediada por receptor, embora a fusão direta à membrana plasmática também tenha sido descrita como mecanismo de penetração. Acidificação nas vesículas endossomais desencadeiam alterações conformacionais na proteína E, que resultam na fusão das membranas virais e celulares catalisada pelo ambiente ácido no endossomo. O vírus é desmontado sendo o nucleocapsídeo liberado no citoplasma e o RNA positivo processado (Figura 3 – 2 , 3 e 4) (Lindenbach & Rice, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

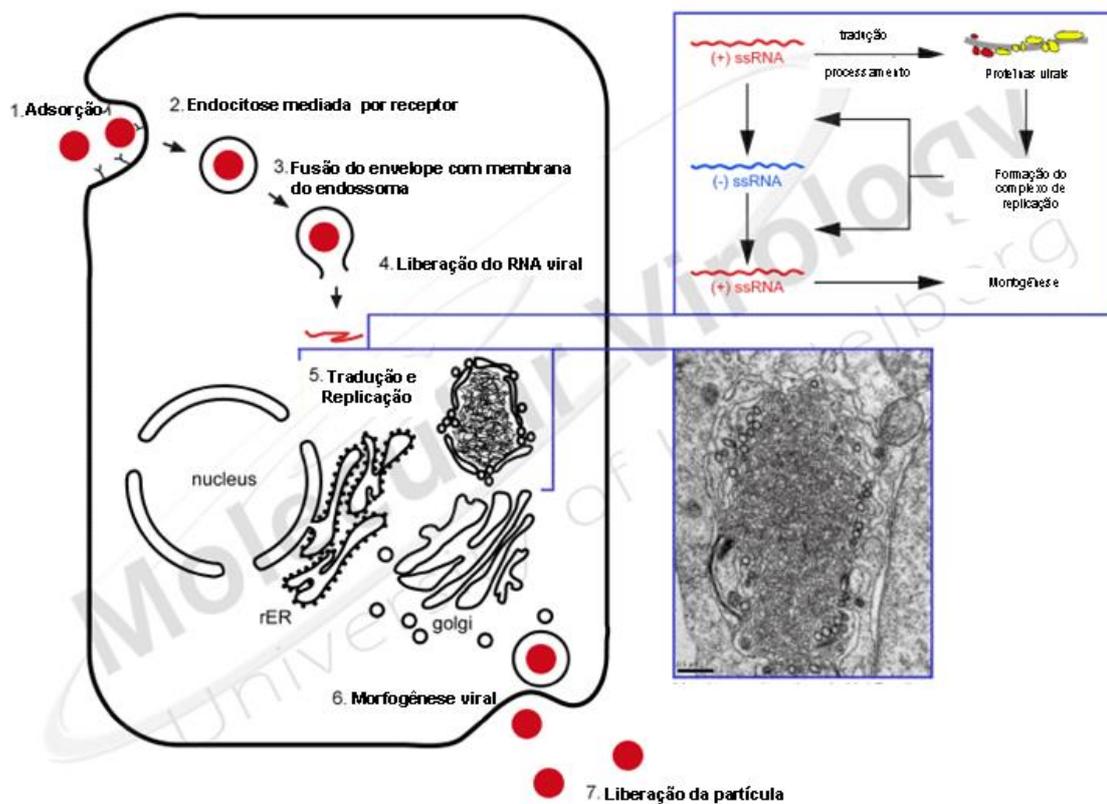


Figura 3: Ciclo de multiplicação do Dengue vírus. Etapas do ciclo: (1) adsorção da partícula viral à célula hospedeira; (2) endocitose mediada por receptor, (3) e (4) fusão do envelope viral com a membrana do endossoma e liberação do nucleocapsídeo viral; (5) e (6) tradução e processamento da poliproteína, replicação do RNA associado à membrana, morfogênese do vírus em vesículas

intracelulares, transporte do vírus e fusão da vesícula na membrana plasmática, (7) liberação do vírus no meio extracelular (Molecular Virology University of Heidelberg).

O RNA genômico no citoplasma é traduzido em uma única poliproteína que é processada co- e pós-traducionalmente por proteases virais e do hospedeiro para produzir componentes da partícula viral e da replicação. O início da tradução comumente ocorre na primeira metionina (AUG) ao longo da ORF, mas também pode ocorrer no segundo AUG localizado de 12 a 14 códons à frente em vírus do gênero *Flavivirus* veiculados por mosquitos. (Figura 03 – 5) (Lindenbach & Rice, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Após a tradução do mRNA genômico, a replicação se inicia com a síntese de fitas complementares negativas, as quais são usadas como moldes para a produção de fitas positivas adicionais. As fitas negativas são produzidas 3 horas após infecção. As fitas positivas podem ser usadas para a tradução das proteínas estruturais e não estruturais, para a síntese de fitas negativas ou podem ser encapsidadas, formando o vírus. As fitas positivas de RNA são sintetizadas a partir de fitas moldes negativas por um processo semiconservativo. A síntese do RNA viral é assimétrica devido ao maior acúmulo de fitas RNA positivas em relação às fitas RNA negativas (10:1 fitas). A replicação do RNA ocorre em complexos de replicação no citoplasma que estão associados à membrana perinuclear como na síntese do RNA fita negativa intermediária (Figura 3 - 5) (Lindenbach & Rice, 2001; Lindenbach *et al.*, 2007).

Estudos ultraestruturais indicam que a morfogênese dos vírus ocorre em associação com membranas intracelulares. Estudos de microscopia eletrônica de células infectadas por flavivirus têm, constantemente, mostrado vírus morfologicamente maduros dentro do lúmen de um compartimento que se acredita ser o retículo endoplasmático ou acumulados, desordenadamente, dentro de vesículas associadas à membrana (Figura 3 – 6). O transporte das nascentes virais recém-formados através do retículo endoplasmático para a superfície celular ocorre por um processo de exocitose. A liberação dos vírus maduros ocorre pela via secretória do

hospedeiro através da fusão com a membrana plasmática para o compartimento extracelular (Figura 3 – 7) (Lindenbach & Rice, 2001; Lindenbach *et al.*, 2007).

1.1.1.4 – Ciclo de Transmissão

Os quatro sorotipos do DENV têm uma história natural similar, sendo o homem o hospedeiro vertebrado e os mosquitos do gênero *Aedes* do subgênero *Stegomyia* (especialmente o *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e o *Ae. polynesiensis*) os vetores (Rodhain & Rosen, 1997, citado por McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000).

A transmissão vetorial ocorre através da picada do mosquito vetor *Ae. aegypti*, que é o principal envolvido na transmissão urbana da doença. Este mosquito possui hábitos domésticos, e prefere alimentar-se em humanos (antropofílico) durante o dia. É um mosquito urbano que se procria em águas estocadas para uso doméstico ou coletadas de águas de chuva em reservatórios (Henchal & Puntak, 1990).

A transmissão do vírus pode ser horizontal ou vertical, tendo esta última importância epidemiológica pela possibilidade de estabelecer novos focos de dengue com a importação de materiais que contenham ovos infectados (Veléz *et al.*, 1998). Outras espécies do gênero *Aedes* também estão envolvidas como vetores secundários como na transmissão vertical do DENV, como o *Ae. albopictus* e *Ae. polynesiensis* (Gubler, 1998 revisado por Mackenzie *et al.*, 2004). A transmissão transovariana do DENV e do vírus febre amarela foi demonstrada em *Aedes albopictus* de maneira que, em percentual variável, as fêmeas filhas de um espécime portador já nascem infectadas (Cecílio, 2002).

Estudos de competência vetorial de diferentes linhagens de *Ae. albopictus* introduzidos nas Américas indicam que esta espécie é um vetor competente de febre amarela. Por sua ampla valência ecológica, adaptando-se facilmente aos ambientes rural, urbano e periurbano, presume-se que possa servir de ponte entre os ciclos silvestre e urbano da febre amarela. Até o momento, na América, o mosquito não foi implicado na transmissão de dengue, mas no Brasil, amostras de DENV- 1 foram isoladas de larvas coletadas na cidade de Campos Altos, Estado de Minas Gerais (Chiaravalloti *et al.*, 2002; Cecílio, 2001). O *Aedes albopictus* é considerado um vetor competente de pelo menos 22 arboviroses (revisado por Gratz, 2004).

Muito se tem pesquisado sobre a competência vetorial de *Aedes albopictus*. Gratz (2004) relatou a existência de larvas do mosquito infectadas por DENV em Minas Gerais. Em nosso laboratório foram analisados 69 pools de larvas, eclodidas em laboratório, a partir de armadilhas em diferentes regiões endêmicas de Belo Horizonte. Destes, 12 pools (17,4%) foram positivos por RT-PCR, 9 pools foram identificados como *Ae. aegypti* e 3 como *Ae. albopictus* (Evangelista, 2003). Entretanto, permanece incerta a capacidade de *Ae. albopictus* em transmitir o vírus no continente americano.

O mais importante ciclo de transmissão do ponto de vista de saúde pública é o ciclo endêmico/epidêmico em grandes centros urbanos dos trópicos. Na África e Malásia ocorre um ciclo silvestre que envolve primatas não-humanos e diferentes espécies de mosquitos *Aedes* (Wang *et al.*, 2000).

1.1.1.5 – Manifestações Clínicas

A febre do dengue (FD) é uma doença infecciosa aguda causada por DENV. É caracterizada por uma febre súbita, mialgia, dores de cabeça e em todo o corpo, eritema cutâneo, linfadenopatia, com leucopenia e granulocitopenia absoluta e trombocitopenia moderada. Em muitos casos a doença é autolimitada e raramente fatal. Podem ocorrer manifestações como hemorragias na pele, petéquias e púrpuras, sangramento do intestino e

epistaxe (Gubler, 1998; revisado por Lei *et al.*, 2001). Dados clínicos laboratoriais da FD indicam a leucopenia com neutropenia seguida por uma linfocitose com linfócitos atípicos. Os níveis das enzimas hepáticas no soro pode estar moderadamente elevados, e em alguns pacientes os níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) alcançaram 500 a 1000 U/L (Gubler, 1998).

A partir da FD formas graves da doença podem se desenvolver como a febre hemorrágica do dengue (FHD) ou síndrome do choque do dengue (SCD). A FHD é uma doença febril grave caracterizada por anormalidades na homeostase e aumento da permeabilidade vascular como a principal anormalidade patofisiológica observada na FHD/SCD que leva ao derramamento de plasma no compartimento extravascular, resultando em hemoconcentração e diminuição da pressão sanguínea. Em um pequeno grupo de pacientes com FHD/SCD, o vírus pode causar alterações graves como redução de consciência, convulsões e doença neurológica similar a encefalites virais (Shresta *et al.*, 2004).

As manifestações no sistema nervoso central (SNC) são raras na infecção por DENV e, ocasionalmente, o vírus ultrapassa a barreira cérebro-sangue infectando o líquido cerebrospinal (Solomon & Mallewa 2001; Gúzman & Kourí, 2002). Solomon e colaboradores (2000) amplificaram o RNA viral de amostras de líquido cerebrospinal (FCS) obtido durante a fase aguda do dengue.

Em 1995, as manifestações mais freqüentes foram reduzida consciência, convulsões e encefalite em pacientes no sul do Vietnã (Solomon *et al.*, 2000). As desordens neurológicas incluem encefalopatia, mononeuropatia periférica e polineurite. A desordem neurológica central parece ser mais freqüente em FHD que na FD (Burke & Monath, 2001). RNA de DENV foram detectado por PCR no FCS e no cérebro e antígenos virais foram detectados por imunohistoquímica no cérebro de casos fatais

(Nogueira *et al.*, 1999; Nogueira *et al.*, 2002). No Brasil, o envolvimento do SNC também foi descrito durante epidemias de dengue (Nogueira *et al.*, 2005). Há um relato de caso de uma paciente brasileira com encefalopatia hemorrágica, por DENV -3, diagnosticada por tomografia e ressonância magnética, 12 dias após hospitalização (de Souza *et al.*, 2005). Recentemente, foram analisados por PCR no soro (85 pacientes) e FCS (13) com positividade de 56,5% e 54% respectivamente, na fase aguda da infecção. Em dezoito pacientes houve manifestações neurológicas com encefalite, encefalopatia e um com meningite (Domingues *et al.*, 2007).

1.1.1.6 - Patogênese

A Dengue é uma doença febril aguda causada pela infecção com um dos quatro sorotipos (1- 4) do DENV, que podem causar uma enfermidade grave e mortal, e confere imunidade prolongada contra a infecção com o vírus homólogo, mas não confere imunidade contra a infecção com o vírus heterólogo. Assim, pessoas habitando uma mesma área endêmica de dengue podem ser infectadas por três ou, provavelmente, pelo os quatro sorotipos do DENV durante a vida (Gubler, 1998; revisado por Green & Rothman, 2006).

Após a pessoa ter sido picada por um mosquito infectado, ocorre um período de incubação de 3 a 14 dias (média de 4 a 7 dias), iniciando-se depois um período de febre súbita (Gubler, 1998). Durante este período febril agudo, de dois a dez dias, o *Dengue virus* circula no sangue periférico (Gubler *et al.*, 1981 revisado por Gubler, 1998). Durante o estágio de viremia, mosquitos podem se infectar pela picada e, subseqüentemente, após um período de incubação extrínseco de 8 a 12 dias a fêmea do vetor pode transmitir o vírus para outros indivíduos não infectados (Gubler, 1998 revisado por Mackenzie *et al.*, 2004).

O entendimento da patogênese da FHD e SCD tem obtido importantes avanços desde os estudos da estrutura do vírus até mecanismos de replicação do genoma e função de proteínas, contudo é ainda desafiante e controversa. Uma das hipóteses cita fatores do hospedeiro com diferenças na susceptibilidade de acordo com variações de sexo, idade, genética, e infecções pré-existentes (Burke & Monath, 2001; Guzman *et al.*, 2002; Holmes & Twiddy, 2003). A outra hipótese assume que os vírus pode sofrer variações genéticas como resultado de uma pressão seletiva determinando a existência de algumas amostras de vírus, genótipos, mais virulentas e com um grande potencial epidêmico (revisado por Gubler, 1998). Há algumas correlações entre sorotipos e genótipos e a gravidade da doença, existem indicações que genótipos dos DENV-2 e DENV-3 são associados a FHD (Rico-Hesse *et al.*, 1997; Messer *et al.*, 2003). Em geral, o genótipo Asiático é descrito como mais virulento que os vírus encontrados nas Américas e Pacífico Sul. Através de análises filogenéticas foi demonstrado que genótipos americanos estão associados com FD, enquanto os vírus Asiáticos estão correlacionados com FHD (Clyde *et al.*, 2006). Estudos moleculares têm confirmado a variabilidade genética dos DENV na natureza com observação de alterações fenotípicas (Lanciotti *et al.*, 1994; Rico-Hesse *et al.*, 1997).

A hipótese, comumente, aceita e que parece desempenhar um papel central na patogênese é a exacerbação imune dependente (ADE) (Halstead, 1988 revisado por Lei *et al.*, 2001). Esta hipótese preconiza que anticorpos adquiridos em infecções prévias, específicos para um determinado sorotipo do DENV, não seriam neutralizantes para um vírus de outro sorotipo, responsável pela infecção atual. Anticorpos heterólogos contra DENV preexistentes reconheceriam o vírus infectante e formariam o complexo antígeno-anticorpo, capaz de facilitar a penetração dos vírus, através da ligação a receptores Fc_γ de membrana de células-alvos como monócitos. Além disso, seriam infectadas células do baço e fígado incluindo linfócitos, células de Kupffer e macrófagos alveolares (revisado por Green & Rothman, 2006). Anticorpos não-neutralizantes seria, em parte, responsáveis pelo

aumento do risco de FHD/SCD em infecções secundárias com um sorotipo heterólogo (Halstead, 1988; Halstead *et al.*, 2003).

Todavia, outros estudos demonstram que há casos de FHD associados com infecção primária (Balmaseda *et al.*, 2006) e casos de FHD em crianças (Halstead *et al.*, 2002). Devido à produção e secreção de mediadores vasoativos por aquelas células em resposta à infecção pelo DENV, poderia ocorrer o aumento da permeabilidade vascular levando a hipovolemia e choque (Halstead, 1988).

Em FHD ocorre uma leucopenia, com presença de linfócitos atípicos e anormalidades na coagulação (Sollomon & Mallewa 2000). Estudos têm indicado que o número total de linfócitos é reduzido durante a infecção aguda com DENV (Azeredo *et al.*, 2001), como também pacientes infectados com o DENV desenvolvem leucopenia com neutropenia (revisado por Lei *et al.*, 2001). Pacientes que evoluíram para FHD apresentaram números absolutos mais baixos de células T e B e natural “killer” (NK) que os pacientes que não progrediram para uma doença mais grave (Green *et al.*, 1999 revisado por Fink *et al.*, 2006).

O mecanismo de patogênese, ADE, que é responsável pelo extravasamento de plasma observado na FHD é uma consequência direta do aumento da carga viral (revisado por Green & Rothman, 2006). O aumento no número de monócitos infectados resulta em níveis elevados de ativação de células T, refletindo em um aumento na apresentação de antígeno (revisado por Lei *et al.*, 2001). As concentrações de citocinas, mediadores e receptores solúveis se encontram, significativamente, aumentados durante a infecção pelo FD e FHD (Fink *et al.*, 2006).

As células T ativadas (CD4⁺) produzem diversas citocinas como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-2 (IL-

2), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Além disso também os monócitos/macrófagos infectados pelo *Dengue virus* produzem TNF- α , IL-1 β , IL-6 e fator de ativação de plaquetas (PAF). A cascata de complemento é ativada pelo complexo vírus –anticorpo, bem como, por várias citocinas para liberar C3a e C5a que tem efeito direto na permeabilidade vascular. A rápida elevação e o efeito sinérgico de IFN- γ , TNF- α e proteínas do complemento ativadas (C3a e C5a) desencadeiam o derrame do plasma, choque, disfunção no sistema de coagulação conduzindo ao quadro hemorrágico em uma infecção secundária do vírus (Kurane & Ennis, 1997 revisado por Gubler, 1998; revisado por Lei *et al.*, 2001).

1.2 – Resposta imune inata

O sistema imune detecta e elimina microorganismos patogênicos invasores por diferenciar entre o “próprio” e o “não-próprio”. Em vertebrados, a resposta imune a patógenos microbianos, é baseada em componentes do sistema imune inato e adaptativo. Os vertebrados são os únicos que conseguem desenvolver a resposta imune adaptativa. A resposta inata é imediata e, amplamente mediada por leucócitos, tais como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, algumas fagocitando os patógenos e outras coordenando respostas adicionais com a conseqüente síntese de uma ampla variedade de mediadores inflamatórios e citocinas (Imler & Hoffmann, 2001). A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra infecções microbianas, já a imunidade adquirida está envolvida na eliminação de patógenos em uma fase mais tardia da infecção, por expansão clonal de linfócitos, gerando uma memória imunológica (Akira *et al.*, 2006). O principal aspecto da resposta imune inata antiviral é a síntese e a secreção dos interferons (IFN) tipo I como IFN- α e IFN- β , os quais exibem funções antivirais, antiproliferativa e imunomodulatória (Honda *et al.*, 2005 revisado por Seth *et al.*, 2006).

Após a descoberta das proteínas *Toll* em *Drosophila*, que participam da polarização dorso-ventral do embrião (Anderson *et al.*, 1985), foi descoberto que toll também é responsável por uma efetiva resposta imune no controle de *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre *et al.*, 1996) em moscas adultas,

acumulando evidências que o sistema imune inato reconhece, especificamente, microorganismos invasores. Os alvos para o reconhecimento imune inato são padrões moleculares conservados ou “Padrões Moleculares Associados aos Patógenos” (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) destes microorganismos. Receptores em imunidade inata são denominados de receptores de reconhecimento padrão (“pattern recognition receptors” - PRRs) (Medzhitov & Janeway, 1997). PAMPs são estruturas conservadas em muitos patógenos, sendo essenciais para sobrevivência microbiana e possibilitando à imunidade inata reconhecer microorganismos com limitados números de PRRs (Uematsu & Akira, 2006). Entre os PRRs, os receptores Toll-like (TLRs) foram identificados através da análise de banco de dados, sendo homólogos em mamíferos. Os TLRs foram destaques como a estrutura de reconhecimento chave do sistema imune inato nos últimos anos (revisado por Uematsu & Akira, 2006). TLRs são capazes de distinguir uma variedade de microorganismos, ou seja, bactérias, fungos, protozoários e vírus.

A família TLR, hoje, consiste de 13 membros em mamíferos com uma via de sinalização intrínseca e induzindo a uma resposta biológica específica contra microorganismos. TLRs são expressos em diversas células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas, células B e tipos específicos de células T e também em células não participantes do sistema imune como fibroblastos e células epiteliais. O reconhecimento de componentes microbianos por estes receptores desencadeia uma via de transdução de sinal que induz a maturação de células dendríticas e produção de citocinas (Akira *et al.*, 2006).

TLRs são glicoproteínas de membrana tipo I, caracterizadas por conterem um domínio extracelular com motivos de ricas repetições em leucina (“leucine rich repeats”- LRR) e um domínio requerido para iniciar a sinalização intracelular (porção citoplasmática) homólogo ao receptor de interleucina-1 (IL-1R) denominado domínio do receptor *Toll*/IL-1R (TIR). O

domínio LRR é responsável pelo reconhecimento dos PAMP's (Bowie & O'Neil, 2000, revisado por Akira *et al.*, 2006).

Lipopolissacarídeos (LPS), compostos de lipídio A (endotoxina), componentes da parede de bactérias gram-negativas são reconhecidos por TLR-4, através do complexo TLR-4/MD2/CD14, que está presente em macrófagos e células dendríticas (Shimazu *et al.*, 1999). A estimulação por LPS é seguida por um aumento físico de proximidade entre CD14 e TLR-4, sugerindo que CD14 e TLR-4 podem interagir na sinalização desencadeada por LPS. MD-2 identificada como uma molécula que se associa com a porção extracelular de TLR4 e acentua a resposta inata ao LPS (Takeda *et al.*, 2003). Algumas proteínas virais de envelope podem ser reconhecidas por TLR-2 e TLR-4. Esta detecção resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, mas não de IFN tipo I, implicando em uma resposta que leva à inflamação, mas não a uma efetiva resposta antiviral específica. A proteína de fusão (F) do vírus respiratório sincicial (RSV) foi identificada como um componente viral que ativa TLR-4 (Kurt-Jones *et al.*, 2000 revisado por Akira *et al.*, 2006).

TLR-2 tem como papel principal detectar uma variedade de componentes bacterianos de gram-positivos como lipoproteínas, peptidoglicanos e ácido lipotécico (LTA). TLR-1 ou TLR-6 formam heterodímeros com TLR-2, os quais estão envolvidos na discriminação entre estruturas moleculares de lipopeptídeos diacil e triacil (Takeuchi *et al.*, 2001; Akira 2004 revisado por Uematsu & Akira, 2006). TLR-2 pode ser ativado por vírus ou componentes virais como proteínas da hemaglutina do vírus do sarampo (MV), CMV humano e HSV-1 (revisado por Akira *et al.*, 2006). Kurt-Jones e colaboradores (2004) mostraram que a resposta de citocinas mediada via TLR-2 por HSV-1 é responsável por uma significativa taxa de morbidade e mortalidade associada à infecção com HSV-1.

Os vírus contêm materiais genéticos compostos por DNA ou RNA, que codificam para proteínas estruturais virais e enzimas de replicação. Vários componentes estruturais, incluindo DNA viral, RNA fita dupla (dsRNA), RNA fita simples (ssRNA) e glicoproteínas de superfície, são reconhecidos como PAMPs por TLRs e outros PRRs. O reconhecimento de compostos virais por PRRs, comumente, induz à produção de IFN tipo I que podem ativar células alvos de maneira autócrina e parácrina (Akira *et al.*, 2006). Os TLRs 3, 7, 8 e 9 são os principais PRRs que reconhecem diferentes tipos de ácidos nucleicos virais (Seth *et al.*, 2007). Estes TLR's são exclusivamente localizados em compartimentos como endossomos, sugerindo que esses TLRs reconhecem ácidos nucleicos após a internalização e lise dos vírus. Durante a replicação viral, é gerado dsRNA, reconhecido por TRL-3, o qual está envolvido, também, no reconhecimento de análogo sintético de dsRNA, poly I:C, um potente indutor de IFN's tipo I (Alexopoulou *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2003). TRL-3 está implicado no reconhecimento de dsRNAs derivados de vírus como o reovírus ou vírus ssRNA como vírus respiratório sincicial, EMCV e *West Nile virus* (Schulz *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004 revisado por Kawai & Akira 2007).

TRL-7 e TRL-8 são proteínas estruturalmente conservadas. TRL-7 foi, inicialmente, identificada como um receptor capaz de reconhecer derivados de imidazoquilinas com atividade antiviral, como imiquimode e resiquimode (R-848), e análogos de guanossina como loxoribina, as quais têm atividade antiviral e antitumoral. ssRNA ricos em guanossina e uridina, como os que são derivados de vírus da imunodeficiência humana (HIV) e influenza vírus foram identificados como ligantes naturais de TLR-7. TRL-8 humano, preferencialmente, medeia o reconhecimento de ssRNA derivado do HIV e R-848 (revisado por Kawai & Akira 2007). Camundongos deficientes em TLR-8 respondem, normalmente, a estas moléculas, sugerindo que TLR-8 murino deve não ser funcional (Heil *et al.*, 2004).

TLR-9 reconhece motivos CpG (citidina-fosfato-guanosina) não-metilados que estão presentes com alta frequência em patógenos como os vírus e bactérias, contudo são raros em vertebrados (Hemmi *et al.*, 2000). Motivos CpG são encontrados em genoma de vírus DNA, como HSV-1, HSV- 2 e citomegalovírus murino (MCMV). Células dendríticas plasmocitóides (pDCs) reconhecem motivos CpG no DNA de HSV-2 via TLR-9 e produzem IFN- α (Lund *et al.*, 2003 revisado por Uematsu & Akira, 2006).

Recentemente, foi descrito que microorganismos como bactérias e vírus são reconhecidos pelo sistema imune inato, através de outros PRRs, independentes de TLRs. É o caso de proteínas induzidas por ácido retinóico I (RIG-I), semelhante à helicases (RLHs) ou com domínios ricos em repetições em leucina e oligomerização de nucleotídeos (NOD-LRR). Estes PRR's disparam distintas vias de sinalização intracelular, como a ativação enzimática de proteases celulares, as quais levam à maturação de citocinas (Takeuchi & Akira, 2007).

1.3 - Resposta inata e Dengue virus.

Durante a fase aguda da infecção com DENV a resposta imune inata, provavelmente, desempenha um papel importante no curso da doença, particularmente, na infecção primária (Navarro-Sánchez *et al.*, 2005). Como parte da resposta inata, o SNC tem duas importantes células que respondem a infecção, micróglia e astrócitos. A micróglia é funcionalmente comparável a monócitos e outros macrófagos teciduais, estas expressam importantes TLRs no reconhecimento de patógeno, processamento e apresentação de antígeno para células T e estas são capazes de produzir quantidades de TNF e óxido nítrico (NO) como outros mediadores solúveis danosos aos neurônios. IFN- γ é, primariamente, produzido por células NK durante a resposta imune inata, podendo ser produzido por outros tipos celulares, linfócitos T, durante resposta imune adaptativa (Lindenbach *et al.*, 2007). IFN- α/β , bem como IFN- γ , inibem a infecção por DENV *in vitro*, somente quando o tratamento precede a infecção (Diamond *et al.*, 2000). Modelos animais de infecção com DENV têm mostrado

a importância dos interferons na proteção contra o vírus *in vivo*. Em camundongos deficientes em ambos os receptores IFN- α/β e - γ (AG129), a multiplicação do vírus é maior que em camundongos não deficientes, e todos os animais deficientes são susceptíveis a infecção pelo DENV (revisado por Clyde *et al.*, 2006). Kurane e colaboradores (1991 e 1993) desenvolveram os primeiros estudos clínicos, e mais recente, estudos mostram níveis elevados dos IFN- α (Libraty *et al.*, 2002) e IFN- γ em pacientes FD e FHD quando comparados a pacientes saudáveis (Chakravarti & Kumaria, 2006).

Em pacientes adultos de Taiwan com FD e FHD, foram detectados níveis mais altos de IFN- γ que os controles. Contudo, os pacientes que evoluíram para o óbito, a citocina não foi detectada no soro (Chen *et al.*, 2006). Assim, é sugerido que altos níveis de interferons- α e - γ , em resposta à infecção por DENV, são parte do efeito de proteção do hospedeiro e que menores níveis de IFN- γ estão no contexto de doença grave, refletindo uma resposta inadequada (revisado por Clyde *et al.*, 2006). Células NK são uma das principais células produtoras de IFN- γ , as quais são importantes na eliminação de infecções por DENV. Azeredo e colaboradores (2006) encontraram que células NK ativadas estão associadas à FD, ao passo que a falta dos marcadores de ativação destas células estão associados à doença mais grave. Em pacientes tailandeses (Green *et al.*, 1999) foi mostrada uma diminuição absoluta na contagem de células NK em pacientes com FHD comparados com FD ou controles.

Vitarana e colaboradores (1991) foram os primeiros autores que mostraram altos níveis de TNF- α em soro de pacientes com FHD. TNF- α age na ativação de macrófagos e é uma das principais citocinas que regulam a imunidade inata e medeiam os processos inflamatórios agudos. A acumulação excessiva da citocina é a principal causa de complicações sistêmicas como o choque. TNF- α se liga às células através de dois receptores, o TNFr p75Kd e o TNFr p55Kd, e regula a expressão de vários genes em muitos tipos celulares importantes para a resposta do hospedeiro à infecção. O receptor TNFr p55 tem uma participação crítica em injúrias teciduais dependente de complemento

(Chaturverdi, 2006). A liberação sistêmica de TNF deve ser a responsável pelo aumento da permeabilidade vascular observado na FHD/SCD (Anderson *et al.*, 1997 revisado por Clyde *et al.*, 2006). TNF- α é liberado *in vitro* em PBMC (Espina *et al.*, 2003) e em células endoteliais (Carr *et al.*, 2003) infectadas com DENV. Chakravarti & Kumaria, 2006 descreveram que os níveis de TNF- α são significativamente mais elevados em pacientes com FD e FHD e que estes níveis continuam relevantes em infecções secundárias. Em camundongos BALB/c infectados, via i.p., com DENV-2, adaptado, há um pico na concentração de IL-1 β , TNF- α e IL-6 com mortalidade. Todavia quando estes camundongos são tratados com soro anti-TNF- α , a mortalidade é reduzida em 60%, uma indicação de um efeito imunopatológico por TNF- α (Atrasheuskaya *et al.*, 2003 revisado por Fink *et al.*, 2006). Desta forma, a associação de TNF- α com a gravidade da doença é confirmada, independentemente, dos modelos murinos (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Shresta *et al.*, 2006) de infecção por DENV. Em ambos os casos altos níveis da citocina foi detectado em animais doentes e anticorpos anti-TNF- α atenuaram o fenótipo da doença.

Assim, o aumento de TNF- α em pacientes, combinado às evidências *in vitro* e *in vivo*, mostram que TNF- α deve estar envolvido na patogênese do DENV (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Hober *et al.*, 1996). Outras citocinas, além dos IFNs e TNF- α que também estão envolvidas em FHD/SCD, freqüentemente, são IL-6, IL-8 e IL-10 (Clyde *et al.*, 2006).

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória com efeito pleotrópico relacionada com regulação negativa da resposta inflamatória (Borish & Steinke 2003). Chen e colaboradores (2006) mostram no soro de pacientes adultos, altos níveis de IL-6, IL-10 e do fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) correlacionando com doença grave (FHD) comparando com pacientes com FD. Pérez e colaboradores (2004) mostram altos níveis de IL-10 no soro de pacientes hospitalizados, com FD e FHD, comparado aos controles, como em pacientes com infecções secundárias. Assim todos os pacientes com FHD

tinham altos níveis de IL-10. Contudo, níveis de IL-12 não diferiam entre pacientes e controles.

IL-6 está relacionada com várias alterações locais e sistêmicas durante uma reação inflamatória aguda (Akira *et al.*, 1993). Esta interleucina é produzida por monócitos/macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, é capaz de estimular a quimiotaxia de neutrófilos e liberação de enzimas, assim levando a uma destruição tecidual quando produzida em excesso (Liu *et al.*, 2003). IL-6 está envolvida na regulação de um estado inflamatório anormal, encontrando-se elevada no sangue (Ayala *et al.*, 1991; Ertel *et al.*, 1995; Schutte *et al.*, 1996) após dano tecidual, como desempenha um papel importante na geração de edema durante processo inflamatório (Maruo *et al.*, 1992).

Wang e colaboradores (2006) estimularam células dendríticas plasmocitóides (pDCs) com *Dengue virus 2*, *Influenza virus*, R-848 (agonista de TLR-7) e CpG 2336 (agonista de TLR-9) na presença e na ausência do antagonista de TLR-7, IRS 661. O trabalho mostra que *Dengue virus 2* é capaz de induzir a secreção de IFN- α em pDCs humanos, como *Influenza virus* e R-848, contudo a produção de IFN- α foi, significativamente diminuída na presença do inibidor IRS 661 comparado sem o inibidor ou o controle ODN (oligodeoxiribonucleotídeo). Desta forma, *Influenza virus* e *Dengue virus 2* ativam pDCs humanos por um mecanismo TLR-7 dependente.

Algumas quimiocinas como CXCL10/IFN-inducible protein 10 (IP-10), têm sido amplamente estudadas em modelos murinos com infecção no SNC. IP-10 desempenha um papel importante no tráfego e recrutamento de células T efetoras e células NK que expressam o receptor CXCR3. Hsieh e colaboradores (2006) utilizaram um modelo de *Dengue virus* que induz doença neurológica em camundongos selvagens (WT) e deficientes em CXCR3 para avaliar o papel das quimiocinas CXCR/IP-10 e CXCR3, na defesa do hospedeiro contra infecção por dengue. O estudo mostra que ambos o receptor

(CXCR3) e a quimiocina possuem um papel crucial em mediar a resistência à infecção primária pelo *Dengue virus*, neste modelo *in vivo*.

Lee e colaboradores (2006) propuseram a quimiocina “monocyte chemoattractant protein -1” (MCP-1) como uma nova candidata na regulação de permeabilidade celular em pacientes com FHD/SCD. MCP-1 é um membro da família de quimiocinas CC e tem um papel importante em dirigir células mononucleares para dentro de locais de infecção, inflamação ou traumatizados. A alta expressão de MCP-1 em várias doenças crônicas (diabetes, arterioscleorose) deve ter diferentes papéis e causar vários sintomas. Desta forma, pacientes com *Dengue virus*, combinado com outra doença que induz a expressão desta quimiocina, apresentam risco mais alto de progressão para FHD/SCD que paciente com dengue sem qualquer complicação.

1.4 – Modelo animal

Várias tentativas foram realizadas para desenvolvimento de modelos animais para FD e FHD, principalmente no início do século 20. Muitos estudos, revisões por Simmons e colaboradores (1931), mostram um amplo espectro de hospedeiros animais: galinhas e outras aves, pombos, cachorros, porcos, coelhos, ratos, camundongos e hamsters, não apresentaram sinais da doença após inoculações com altas doses do vírus e por diferentes vias (Bente & Rico-Hesse, 2006).

Camundongos não são hospedeiros naturais do *Dengue virus*. Entretanto, é bem conhecido que o vírus pode se multiplicar em cérebro de camundongos neonatos (Meiklejohn *et al.*, 1952). Há variações de susceptibilidade das diferentes linhagens de animais a infecção pelo *Dengue virus*, quando o vírus é inoculado via intracraniana (i.c.) (Raut *et al.*, 1996 revisado por Lei *et al.*, 2001). Camundongos SCID (“severe combined immunodeficient”) reconstituídos com células monucleares do sangue

periférico (PBMC) humanas e infectadas com *Dengue virus 1* foram os primeiros utilizados para desenvolver um modelo animal (Wu *et al.*, 1995). Contudo, somente alguns destes camundongos foram susceptíveis ao *Dengue virus 1*. Nos últimos anos, vários grupos descreveram a multiplicação do *Dengue virus* em camundongos AG129, os quais são deficientes no receptor dos IFN- α / β e IFN- γ , ou em animais SCID, utilizando amostras de isolados humanos e neuroadaptadas (Johnson & Roehring, 1999; Lin *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999). Johnson & Roehring (1999) mostram a multiplicação de *Dengue virus 2*, protótipo “New Guinea C” (NGC), adaptado ao modelo murino, administrados via intraperitoneal (i.p.), em camundongos AG129. Os camundongos apresentaram paralisia dos membros posteriores e cegueira, entre o 7 e o 12º dia pós-inóculo (p.i.) e todos os animais morreram. Foram utilizados camundongos SCID transplantados com células de eritroleucemia humana (K562) inoculados, intratumor e via i.c., com diferentes amostras humanas e adaptadas (Lin *et al.*, 1998) e com células humanas de hepatocarcinoma (HepG2) inoculados, via i.p., com um isolado humano (Tr1751) de paciente com FD (An *et al.*, 1999).

Em camundongos SCID, transplantados com células K562 e HepG2 a inoculação de amostras de *Dengue virus 2* causaram sinais de paralisia neurológica dos membros posteriores e morte duas semanas p.i. Em camundongos SCID transplantados com células HepG2 foram descritos, também, sinais clínicos como aumento de hematócrito e trombocitopenia (revisado por Lei *et al.*, 2001). Altos títulos do *Dengue virus 2* foram encontrados no cérebro, que foram correlacionados com a progressão da encefalopatia. Os dados sugerem que camundongos são hospedeiros permissivos para multiplicação do *Dengue virus*, contudo não há um modelo de infecção que mimetize FHD/SCD (Huang *et al.*, 2000).

Huang e colaboradores (2000) inocularam camundongos A/J, via intravenosa (i.v.), com amostra e dose 10^8 p.f.u./camundongo do *Dengue*

virus 2 (PL046), isolado humano em Taiwan de paciente com FD, que reproduziu a manifestação de trombocitopenia e uma viremia transiente detectada no 2º dia p.i., por RT-PCR. Entre o 10º e o 13º dia p.i. houve desenvolvimento de trombocitopenia transiente, por detecção de anticorpos antiplaquetas e paralisia dos membros entre 2-3 semanas p.i..

Fatores do hospedeiro são importantes para multiplicação do vírus, pois diferentes linhagens de camundongos apresentam susceptibilidade variável para o *Dengue virus*: A/J ou AKR são mais sensíveis que camundongos BALB/c, C57Bl/6 ou C3H/HeJ, provavelmente, devido a esta linhagem A/J possuir menos linfócitos, monócitos, granulócitos e células NK que camundongos C57Bl/6. A viremia é menor e transiente em camundongos imunocompetentes comparados com animais SCID ou animais deficientes em interferon AG129. Assim, a respostas imunes em especial, a produção de interferons possuem um papel importante na eliminação do vírus (revisado por Lei *et al.*, 2001).

Diversos autores utilizam amostras de *Dengue virus* adaptadas em cérebro de camundongos, especificamente, em modelos BALB/c (Atrasheuskaya *et al.*, 2003), camundongos albino Swiss (Chaturverdi *et al.* 1991) e em AG129 (Johnson & Roehring, 1999). Estudos mostram que células imunes estão envolvidas na resposta de camundongos a infecção primária por *Dengue virus*. Camundongos A/J inoculados, via i.v., com 10⁸ p.f.u. do *Dengue virus 2* (PL046) apresentam sinais de paralisia, entre o 8º e o 14º dia p.i., com detecção de vírus no cérebro, aumento nos níveis de hematócrito, leucopenia. Quando esses animais são desafiados com 10⁷ p.f.u., ou A/J são infectados com 10⁸ p.f.u. de uma outra amostra de *Dengue virus 2* (16681) não há aparecimento de sinais (Shresta *et al.*, 2004a).

Shresta e colaboradores (2004b) descreveram que altas doses (10⁸p.f.u.) do *Dengue virus 2* (PL046) inoculados em camundongos AG129, desencadeiam paralisia dos membros mais rápido que animais WT129,

A129 (IFN- α/β r -/-), ou G129 (IFN- γ r -/-) e ocorre mortalidade total entre 8^o e o 30^o dia p.i. Inoculados estes mesmos vírus, 87% dos camundongos WT129, 100% dos A129 e 57% dos G129 sobreviveram à infecção sem apresentar nenhum dos sinais clínicos. Estudo de dose resposta revelou que 0, 70, 79 e 100% de camundongos AG129 manifestaram paralisia e morte após infecção com doses de 10⁵, 10⁶, 10⁷ e 10⁸ p.f.u., do *Dengue virus 2*, respectivamente.

Paes e colaboradores (2005) caracterizaram o modelo de camundongo de infecção com *Dengue virus 2* por inoculação intraperitoneal de um vírus não adaptado e isolado de paciente humano. Camundongos BALB/c desenvolveram uma aparente infecção leve, com alterações no tecido hepático caracterizado em estudos histopatológicos e bioquímicos. Antígenos virais foram detectados em áreas focais de danos ao fígado, confirmando a presença do vírus no tecido. A viremia foi detectada, no 7^o dia p.i., em muitos animais. Bente e colaboradores (2005) mostraram que camundongos NOD/SCID que combinam a falta do resposta imune inata (células NK) e adquirida (células T e B) quando transplantados com células hematopóieticas humanas, CD34⁺, ou seja, reconstituídos, quando comparados aos animais sem estas células, apresentaram eritema e trombocitopenia como ocorre m humanos.

Recentemente, Shresta e colaboradores (2006) descreveram um modelo murino com camundongos AG129 infectados com uma amostra gerada (D2S10) a partir de um isolado humano (PL046) por dez passagens seriadas alternadas em cultivo de células de mosquito e camundongos AG129 inoculados, via i.v., com um DENV -2. Houve letalidade entre o 3^o e o 5^o dia p.i., contudo não houve infecção em camundongos selvagens. Os camundongos AG129 apresentaram arqueamento do dorso, eriçamento de pêlo e letargia, mas não exibiram paralisia. Houve aumento da permeabilidade vascular em órgãos como intestino, baço e fígado somente

em animais inoculados com a amostra D2S10 e não com a amostra PL046 (parental).

Modelos animais podem auxiliar na compreensão do papel das citocinas na infecção humana e contribuir para o esclarecimento da FHD/SCD (Shresta *et al.*, 2004). Seria importante um modelo que requeresse menores doses do vírus em combinação com camundongos menos imunocomprometidos que possam melhor refletir uma infecção natural do dengue em humanos.

Não há um bom modelo animal para o estudo de patogênese de FHD. Primatas não humanos são hospedeiros naturais para *Dengue virus*, todavia não apresentam sinais da doença. Estes animais permanecem infectados e desenvolvem viremia, porém com títulos mais baixos que em humanos, mas não desenvolvem FHD (Rosen & Gubler, dados não publicados revisados por Gubler, 1998). Vários modelos murinos de infecção por *Dengue virus* tem sido descritos, recentemente, incluindo camundongos deficientes no receptor de interferon α / β e γ , os quais desenvolvem encefalites (revisado por Green & Rothman 2006). Em macacos *Rhesus* infectados secundariamente com *Dengue virus 2*, ou tratados com soro imune de dengue, foi detectada alta viremia evidenciando que ADE ocorre *in vivo*. (Halstead, 1979 revisado por Gubler, 1998). Em resumo, as evidências indicam que tanto o vírus quanto os fatores imunes do hospedeiro possam estar relacionados com a patogênese (Gubler, 1998).

II - JUSTIFICATIVA

Dengue é a mais importante doença arboviral de humanos. Mais de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco sujeito a infecção por *Dengue virus*, nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Burke & Monath, 2001). Estima-se que ocorram, anualmente, entre 50-100 milhões de casos de FD dos quais 500.000 evoluem para FHD/SCD. FHD é responsável por 20.000 mortes, principalmente, no sudeste Asiático, no oeste Pacífico e nas Américas (WHO, 2002). Durante 2002, foram descritos em países da América Latina mais de um milhão de casos de FD com mais de 17 mil casos de FHD e 225 mortes (Nogueira *et al.*, 2005). A FD é uma doença antiga, contudo nos últimos 25 anos houve uma marcante emergência e reemergência do dengue, com mais frequência e epidemias maiores associadas a formas mais graves da doença (Gubler, 2002 revisado por Mackenzie, 2004). Apesar do nome, manifestações hemorrágicas são a minoria e incomuns, ao passo que, o aumento da permeabilidade vascular é um fator marcante na FHD/SCD e anormalidades neurológicas como encefalites podem ocorrer (Solomon *et al.*, 2000). Nos últimos anos, vários estudos tem descrito o envolvimento do SNC cada vez mais frequente em surtos e epidemias. No Brasil, durante uma epidemia houve descrição de envolvimento do SNC em um caso fatal, sendo detectado o RNA de *Dengue virus* 3 no líquido cerebrospinal (Nogueira *et al.*, 2005)

Mecanismos na patogênese da FHD/SCD não são completamente entendidos e na tentativa para conhecer a doença e testar novas drogas e vacinas, inúmeros estudos sugerem o uso de diversos modelos animais (Huang *et al.*, 2000; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Shresta *et al.*, 2004 e 2006). Nenhum destes modelos reproduz, exatamente, sintomas observados em humanos. Foram utilizados camundongos imunocomprometidos (SCID) (Wu *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999) e diversas linhagens de camundongos BALB/c, A/J, AG129 infectados com diferentes amostras e sorotipos do dengue e o uso de animais NOD/SCID reconstituídos com CD34⁺ apresentando sinais clínicos descritos em humanos. Na década passada importantes avanços no estudo da biologia do *Dengue virus* foram alcançados, incluindo a elucidação da estrutura, mecanismos de replicação e caracterização funcional de proteínas, porém a patogênese permanece um desafio em uma complexa interação entre fatores virais e do hospedeiro.

Fatores de risco para a forma grave da doença são idade, sorotipos e genótipos virais bem como a genética do hospedeiro, dentre outros (Gubler, 1998; Messer *et al.*, 2003; Halstead *et al.*, 2001). Assim, o genótipo asiático do DENV tem sido descrito como mais virulento e multiplica-se com maiores títulos em relação ao genótipo americano em macrófagos derivados de monócitos (Cologna *et al.*, 2003). Algumas amostras de *Dengue virus* são mais virulentas que outras e o ADE que ocorre quando complexos anticorpos-virus são internalizados para dentro células via Fc γ R, sozinho não explica todos os casos mais graves da doença (Halstead *et al.*, 1977; Gubler *et al.*, 1979; Gubler *et al.*, 1998). Outra hipótese descreve que a reativação de células T de memória, devido à reação cruzada entre sorotipos, na infecção secundária poderia ocasionar a ativação aumentada de células T com aumento na produção de citocinas e apoptose (Green & Rothman 2006; Mongkolsapaya *et al.*, 2003). A ativação imune precoce e a produção de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-2 dentre outras) parecem estar envolvidas no desenvolvimento do derrame de plasma e doença grave, resultando um quadro de FHD/SCD (Green *et al.*, 1999a e 1999b).

Neste estudo foi analisada a virulência de amostras de *Dengue virus* de pacientes, entre 2001 a 2005, em Minas Gerais e de um isolado de um surto ocorrido em 2006, em Teresina-Piauí. Foi utilizado o modelo de inoculação intracerebral em camundongos imunocompetentes e deficientes em genes de IFN- γ , iNOS e TNFr p55.

III – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar a virulência de amostras de *Dengue virus* isoladas de pacientes com diferentes manifestações da doença em modelo murino.

3.2 – Objetivos Específicos

1. Avaliar o método de purificação para *Dengue virus* (Kunh *et al.*, 2002) e estudar as características morfológicas das partículas virais através da visualização por microscopia de força atômica.
2. Analisar no modelo murino possíveis diferenças biológicas de amostras de *Dengue virus* isoladas de pacientes com diferentes manifestações clínicas da doença.
3. Avaliar o impacto da infecção por *Dengue virus* em células do sangue periférico pela contagem global de leucócitos (mono e polimornucleares) no modelo murino.
4. Avaliar o grau de acometimento de órgãos, por histopatologia, e o envolvimento da resposta imune inata no processo inflamatório gerado na resposta à infecção dos *Dengue virus* no modelo murino.
5. Verificar no cérebro e soro, a produção de citocinas e quimiocinas em camundongos C57Bl/6 e deficientes para IFN- γ e TNFr p55, moléculas da resposta imune inata, infectados com amostras de *Dengue virus* 3.

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Células

4.1.1 - C6/36

Células de linhagem contínua de larvas de mosquito *Aedes albopictus*, C6/36, foram adquiridas do banco de células "American Type Culture Collection" (ATCC). Estas células foram cultivadas em meio Leibowitz-15 (L-15) (Gibco BRL[®], EUA), contendo 50 µg/ml de gentamicina, 2µg/ml de fungizona, 2 µg/ml de ciprofloxacina, 200U/mL de penicilina sódica e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab-Brasil) mantidas em estufa tipo "Biologic Oxygen Demand" (B.O.D.) à 28°C.

Para repiques das monocamadas fechadas, o meio de cultivo foi desprezado e as células lavadas com salina fosfatada (PBS). Após lavagem, as células foram tratadas com solução de tripsina contendo 0,2% de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Em seguida, as células foram homogeneizadas em meio de cultivo celular e distribuídas em garrafas de 25, 75 e 175 cm², acrescentado meio de cultura.

4.1.2 - LLC-MK2

Células LLC-MK2, linhagem derivada de rim de macaco *Rhesus*, foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO BRL[®], EUA) filtrado, suplementado com 50µg/mL de gentamicina, 200U/mL de penicilina, 2µg/mL de fungizona e 5% de SFB, mantidas à 37°C, em estufa com 5% de atmosfera CO₂.

4.2 – Vírus e amostras clínicas

A amostra de DENV- 2 foi gentilmente cedida pelo Dr. Luiz Tadeu Figueiredo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Esta amostra foi isolada em epidemias no município de

Ribeirão Preto/ SP e multiplicada em cérebro de camundongo e em cultivo celular de C6/36.

As amostras de soro enviadas pela Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, foram coletadas de pacientes que apresentaram manifestações clínicas de dengue relacionando com a sintomatologia de FD, manifestações hemorrágicas (MH) e FHD/SCD. Os soros foram de pacientes da região metropolitana de Belo Horizonte, coletados no período de 2001 a 2005 e foram fornecidas informações sobre as manifestações clínicas. Recentemente, amostras de soro de pacientes com manifestações do dengue foram enviadas ao laboratório de vírus pelo Prof^o Luís Felipe Leomil Coelho da Universidade Federal do Piauí (UFPI) de um surto da doença ocorrido na cidade de Teresina, PI, nos anos de 2006 e 2007, com mais de quarenta mil casos registrados naquela cidade.

Foram obtidas as seguintes amostras de vírus e estas foram isoladas a partir de passagens sucessivas dos soros de pacientes em cultivo celular, após efetuar reinóculos na monocamada de células (ver subitem 4.2.1), até a visualização de efeito citopático característico da infecção pelo vírus. Sendo obtidas as amostras: *Dengue virus* 1 (109-FD), *Dengue virus* 1 (240-FHD) em quarta passagem e *Dengue virus* 3 25(MG), 375(MG) genótipo I (Figueiredo *et al.*, 2008) ambos isolados de Minas Gerais e o *Dengue virus* 3 64(PI) genótipo III, isolado de paciente de Teresina, Piauí, todos os DENV-3 foram isolados em terceira passagem em cultura de células C6/36.

4.2.1 – Multiplicação viral

A amostra de DENV-2 foi inoculada com m.o.i de 0,1 em células C6/36 sendo visualizadas diariamente, ao microscópico óptico, até as células apresentarem efeito citopático (ECP) quando comparadas com as células controle. Quando a formação de sincícios foi superior a 50% o sobrenadante foi centrifugado a 1680 x g por 15 min a 4°C em centrífuga Sorvall RT-6000B, rotor H1000B. O sobrenadante clarificado foi coletado e distribuído

em alíquotas de 0,3mL e congelado em freezer a - 70°C até o uso. Para as amostras clínicas de DENV-1 (109-FD) e (240-FHD) e DENV- 3 25(MG), (375-MG) I, descritas acima, foram multiplicadas em 5ª e 4ª passagens, respectivamente, para produção de estoques virais e tituladas para posterior uso.

4.2.2 - Titulação

4.2.2.1 - Determinação de unidades formadoras de placa – UFP

Em placas de 6 câmaras foram implantadas $1,5 \times 10^6$ células/câmara. As células, LLC-MK2, foram cultivadas por 24 horas, em DMEM, com 5% de SFB até apresentarem confluência de 90% e 400 μ L das cinco diluições (10^{-1} a 10^{-5}) seriadas do vírus, a ser titulado, foram inoculadas nas monocamadas de células confluentes, sendo que uma câmara foi utilizada como controle com células com meio de cultura. Após uma hora de adsorção, durante as quais as placas foram homogeneizadas a cada 10 minutos, o meio foi desprezado, as células lavadas com PBS e em seguida foi adicionado o meio semi-sólido contendo 1% de carboximetilcelulose (CMC) (Merck®, Germany) e meio-199 (GIBCO BRL®, EUA), com 2% de SFB, e as placas incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 7 dias a monocamada foi fixada com formol a 10% em PBS por 30 minutos e, posteriormente, foram coradas com solução contendo 1% (p/v) cristal violeta em PBS por 10 minutos. O número de placas de lise foi contado na diluição que apresentar entre 20 e 200 placas. O título das amostras virais foi expresso em unidades formadoras de placa por mililitro (ufp/mL).

4.2.3 - Purificação do *Dengue virus* (Kuhn et al., 2002).

O volume (~180 mL) do sobrenadante com o *Dengue virus* foi clarificado por centrifugação $1.876 \times g$ por 10 min a 4°C (Centrífuga Mega 21R- rotor A50M-6) e, em seguida, precipitado com polietilenoglicol (PEG) 8% p/v em banho de gelo sob agitação constante e suave até a completa solubilização. A

mistura foi mantida em banho de gelo e repouso por 30 min e então centrifugado a 15.000 x g por 30 min hora a 4°C (Centrífuga Mega 21R-rotor A50M-6). O sedimento foi homogeneizado em 1mL em tampão TES (0.01M Tris; 0.15M NaCl; 0.001M EDTA; pH 7.2). Esta suspensão foi depositada sobre um gradiente descontínuo de tartarato de potássio (10 - 40%) e glicerol (7,5 - 30%) e centrifugado a 174.316 x g a 4°C por 1 hora em ultracentrífuga (MWDR-Sorvall® Combi - rotor TH-641). Várias fases ao longo do gradiente foram coletadas em alíquotas de 1,3 mL e titulado vírus de cada uma das frações.

4.3 - Isolamento viral a partir de soros de pacientes (Figueiredo et al., 2008).

Para o isolamento de *Dengue virus* foram utilizados soros de pacientes suspeitos de infecção pelo *Dengue virus* relacionados com a clínica sugestiva para FD e FHD. Garrafas de 25 cm² foram implantadas com C6/36 e crescidas em meio L-15 (GIBCO BRL®, EUA) modificado, suplementado com 10 % SFB. Quando as monocamadas apresentaram 80-90% de confluência, foram inoculadas com 50 µL de soro diluído em 450 µL de meio L-15 (diluídos 1:10) sem SFB e incubadas, por 1 hora, sob homogeneização de 15 em 15 minutos. Em seguida, foi adicionado meio L-15 com 2% de SFB e as células foram mantidas em estufa B.O.D., a 28°C, durante 7 a 10 dias. Após este tempo, os sobrenadantes foram alíquotados e mantidos a - 70 °C. Também foram feitas diluições maiores com objetivo de diminuir a citotoxicidade do soro em células C6/36. 50 µL do soro foram inoculados em 5 mL de meio L-15 (1:100), com 2% de SFB, não sendo feita adsorção durante 1 hora, sendo incubados em estufa B.O.D a 28°C, durante 7 a 10 dias. O isolamento dos vírus em células C6/36 foi obtido após várias passagens cegas.

4.4 – AFM

As partículas de DENV-2 que foram visualizadas neste trabalho foram multiplicadas em células C6/36. Após purificação de acordo com Kunh e

colaboradores (2002) três microlitros foram depositados em substrato de mica clivada e mantidos a temperatura ambiente da sala (~ 18°C) por 10' para secar a gota. Após secar foi lavado, cuidadosamente, com água bidestilada, e rapidamente, secada com jato de argônio e acoplada ao microscópio onde foram capturadas as imagens. Estas imagens foram obtidas, por “tapping mode”, através de sondas comerciais de sílica com força constante de 29-61 N/m e uma curvatura nominal tip radius de 5 - 10nm, utilizando o Nanoscope IIIa Multimolde AFM (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA).

4.5 – Modelo murino

Foram utilizadas as linhagens de camundongos: C57Bl/6, BALB/c com 2 semanas e camundongos adultos entre 5 a 9 semanas de idade. Todos os camundongos foram obtidos do CEBIO (Centro de Bioterismo), do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos, manipulados e sacrificados conforme recomendações do “Guia de Manutenção e Uso de Animais de Laboratório” e de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, conforme protocolo 096/04 aprovado (em anexo). Os camundongos C57Bl/6 IFN- γ -/-, C57Bl/6 TNFr p55 -/- e C57Bl/6 iNOS -/- (cedidos pela professora Leda Quércia/UFMG) foram utilizados neste trabalho.

4.5.1 - Inoculação dos camundongos via intracerebral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica (I.D.) e subcutânea (S.C.).

Os DENV-1 (109-FD), (240-FHD), DENV-3 (25-MG), (375-MG) I, DENV-3 (64-PI) III e DENV-2 padrão foram inoculados em diferentes concentrações, em diferentes volumes de acordo com a via de inoculação em meio L-15 (GIBCO BRL[®], EUA) suplementado com 50 μ g/ml gentamicina sem SFB. As inoculações foram feitas com os animais anestesiados, por via I.C. com 20 μ L, no lobo anterior direito dos camundongos, ou por via I.P. na

porção ventral com 200µL ou por via I.V., pela veia caudal, com 100µL ou pelas vias I.D. e S.C., na porção ventral dos animais, com 100µL dos vírus com o auxílio de seringas de tuberculina descartáveis (BD Plastipak 0,38 x 13- 27,5 G^{1/2}). Camundongos controles, nas diferentes vias de inoculação, passaram por igual procedimento, sendo inoculados com os mesmos volumes do meio de cultivo celular, L-15, ao invés dos *Dengue virus*. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia, ICB / UFMG, em microisoladores, com livre acesso a ração e água, e sob ciclo claro/escuro.

4.5.2 - Anestesia e processos de retirada de órgãos e soro.

Os camundongos foram observados e os sinais clínicos da doença anotados, diariamente. Os animais foram anestesiados (Injeção intraperitoneal de 50µL de uma solução contendo 1.300µL de Ketamina (Vertanarcol[®]) a 50 mg/mL, 200µL de Cloridrato de Xilazina (Kensol[®]) a 20mg/mL e 1.500µL de PBS e sacrificados em diferentes dias pós-infecção. Os órgãos como cérebro, pulmões, fígado e baço foram removidos de maneira asséptica, separados em microtubos e, rapidamente, congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em freezer -70°C quando utilizados para titulação viral e CBA (ver item 4.7) ou em solução de formol 10% em PBS, pH 7,4, quando utilizados para análises histopatológicas.

Os camundongos, anterior ao sacrifício, foram anestesiados e o sangue total dos animais foi coletado com anticoagulante EDTA 0,1M pela veia do plexo braquial dos camundongos. Os soros foram obtidos a partir do sangue total e mantido a 37°C por 15 minutos, 30 minutos a 4°C e em seguida, centrifugado a 3000 r.p.m., em microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5417R), por 10 minutos a 4°C. O soro foi coletado e armazenado, em microtubos, em freezer -70°C para uso.

A eutanásia dos animais com sinais clínicos graves de encefalite por deslocamento cervical, assim como todos os outros processos envolvendo camundongos foi aprovada previamente em projeto de acordo com o CETEA da UFMG.

4.5.3 – Maceração e titulação dos órgãos

Para titulação de vírus dos órgãos dos camundongos, estes foram macerados, com auxílio de pistilos plásticos em 400µL/órgão de meio DMEM sem SFB ou com homogeneizador Polytron. O macerado foi centrifugado a 8000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5417R). Os sobrenadantes coletados de cada órgão foram diluídos nos mesmos procedimentos, do item 4.2.2, e adsorvidos em placa de 6 câmaras com monocamada de células LLC-MK2 confluentes e homogeneizadas por 1 hora a cada 10 minutos. Como controle foi utilizado uma câmara com células não infectadas. Os títulos dos órgãos dos camundongos foram expressos em p.f.u./mL. Os órgãos de camundongos adultos utilizados foram: 200-300 mg de cérebro, 150-200 mg dos pulmões, 400-500 mg do fígado e 100 mg do baço.

4.6 - Cytometric Bead Assay - CBA (BD).

4.6.1 – Ensaio para detecção de citocinas no cérebro e soro de camundongos, por citometria de fluxo, inoculados com diferentes *Dengue virus* .

Para o ensaio, CBA, dos cérebros, 100 mg em média dos cérebros foram pesadas e homogeneizadas em 1mL de solução de extração de citocinas (NaCl 0.4 M, NaPO₄ 10 mM, PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetonio 0.1 mM, EDTA 10 mM, tween 20 0.05%, 0.5% de BSA, 20 mL de aprotinina), numa relação de 10% peso/volume, e posteriormente centrifugados a 250 x g durante 15 minutos a 4°C.

Os homogenatos de cérebro e soros dos camundongos extraídos foram utilizados para quantificação das citocinas e quimiocinas: interleucina -6 (IL-6), interleucina -10 (IL-10), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alpha (TNF- α) e interleucina-12p70 (IL-12p70) pelo sistema CBA (Mouse Inflammation Kit - BD™) de animais inoculados com as amostras *Dengue virus* 3 375(MG) genótipo I e 64(PI) genótipo III com 4×10^2 p.f.u. de ambos os vírus. O ensaio foi realizado conforme com metodologia do fabricante modificado. Uma mistura de 2,5 μ L de cada esfera de captura das seis citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70) avaliadas mais o mesmo volume do diluente G foi preparado e acrescentado 25 μ L a uma placa de poliestireno de 96 poços de fundo em U (NUNC MaxiSorp™). Foram preparadas também alíquotas de 25 μ L de padrões em diluições seriadas com diluente G (Mouse Inflammation Kit CBA - BD™) nas concentrações de 10.000pg/mL a 4,57pg/mL, com 6 pontos do intervalo, para construir uma curva padrão ou com 25 μ L das amostras de sobrenadante de cérebros e soros. O reagente de detecção conjugado a um fluorocromo PE (25 μ L) foi acrescentado a cada poço e incubado por 2 horas a T.A. sobre o abrigo da luz. Foram preparadas alíquotas com 25 μ L de diluente G como controle (branco). Após este período a placa foi lavada com 150 μ L de tampão de lavagem F (Mouse Inflammation Kit CBA - BD™) e centrifugadas 200 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o sedimento com as esferas foram homogeneizados em 200 μ L da solução F. Imediatamente a aquisição dos dados foi quantificada pelo nível de fluorescência das esferas no citômetro de fluxo FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA) e analisados com este programa.

4.7 – Histopatologia

Para estudos histológicos, camundongos foram anestesiados e sacrificados, no 7º e 8º dia p.i., e os órgãos foram fixados por imersão em solução de formol 10% tamponado em PBS por no mínimo 24 horas. Posteriormente, foram submetidos a processamento histológico de rotina para

inclusão em parafina. Cortes de 4 μm foram obtidos em lâminas histológicas, corados por Hematoxilina e Eosina (H&E) e analisados a um microscópio de luz Olympus acoplado a câmera digital. Um sistema de captura de imagens (Pro-Express) foi utilizado para documentação.

4.8 – Quantificação do global de células brancas, leucócitos (WBC), no sangue total dos camundongos.

Depois de anestesiados, no momento do sacrifício dos animais o volume em torno de 300 μL de sangue com EDTA foi coletado através de ponteiros de 1mL, homogeneizado e conduzido ao laboratório de análises clínicas para contagem de células sanguíneas (eritrograma e leucograma) e cálculo de índices hematimétricos por aparelho Coulter Counter S-Plus JR.

4.9 – Análise estatística dos dados

As análises estatísticas são apresentadas como a média \pm EMP por grupo de três até sete animais. Os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPrism versão 3.0, através do teste t de Student's paramétrico ou análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. Para análise das medianas dos dados não-paramétrico foi empregado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para múltiplas comparações. Em quaisquer das avaliações empregadas os níveis de significância dos dados obtidos foram considerados, estatisticamente, relevantes com um valor de $p < 0,05$.

V – RESULTADOS

5.1 – Multiplicação e titulações das amostras virais.

Para obtenção de amostras virais para experimentos, monocamadas de células C6/36 confluentes em garrafas de 175 cm² foram infectadas e adsorvidas com os vírus em uma m.o.i de 0,1 e acompanhadas durante 7-8 dias p.i.. O aparecimento de efeito citopático, com formação de sincícios foi observado em 80% das células. O sobrenadante das células foi coletado e centrifugado. O título foi determinado por ensaio de placas em células LLC-MK2. Foram obtidos *Dengue virus* 1 e 2 títulos de 3×10^6 p.f.u./mL e $7,5 \times 10^6$ p.f.u./mL, respectivamente. Os vírus isolados de amostras clínicas: *Dengue virus* 1 (109-FD) e (240-FHD), *Dengue virus* 3 (25-MG), (375-MG) genótipo I e *Dengue virus* 3 64(PI) genótipo III apresentaram títulos de 2×10^5 p.f.u./mL, 3×10^7 p.f.u./mL, $2,2 \times 10^6$ p.f.u./mL, 2×10^5 p.f.u./mL e 2×10^7 p.f.u./mL, respectivamente.

O sobrenadante de *Dengue virus* 2 foi utilizado para purificação, segundo Kuhn e colaboradores (2002), e conforme materiais e métodos (ver item 4.2.3). A purificação foi feita em gradiente descontínuo de tartarato de potássio e glicerol. Não foi possível visualizar uma banda e as frações do gradiente, do topo ao fundo do tubo, foram coletadas e tituladas para detecção do vírus. A maior quantidade do *Dengue virus* foi detectada em três frações do gradiente com concentração de 16-22% do tartarato e 27.5% -22,5% de glicerol. As maiores quantidades do vírus obtidas foram as frações 3, 4 e 5, com títulos de $4,5 \times 10^4$ p.f.u./mL, 4×10^5 p.f.u./mL, $1,5 \times 10^5$ p.f.u./mL, respectivamente.

5.2 – Visualização e análise ultraestrutural do Dengue virus, por Microscopia de Força Atômica (AFM).

Com o objetivo de visualizar o DENV após purificação em gradiente de tartarato de potássio e glicerol e avaliar a pureza do vírus obtido foram capturadas imagens por microscopia de força atômica (AFM), utilizando Nanoscope IIIa Multimode - AFM (Digital Instruments, Veeco Metrology, Santa Barbara, CA).

As imagens de altura e fase foram capturadas e trabalhadas com ferramentas disponíveis no programa do fabricante (Digital Instruments, Veeco Metrology, Santa Barbara, CA) e através das imagens geradas por AFM foi observada a integridade da partícula, o grau de purificação do vírus (1A-C) em relação às amostras do DENV sem a etapa de purificação (2A-C) em diferentes aumentos (10, 3,5 e 1 μm) nos painéis mostrado na figura 4. Pode ser visualizado no painel 2 (figura 4A-F) que foram encontradas sobre os vírus não-purificados impurezas, possivelmente, originadas de proteínas celulares, debris celulares e/ou sais contidos no meio de cultura, como visto na imagem da figura 4F.

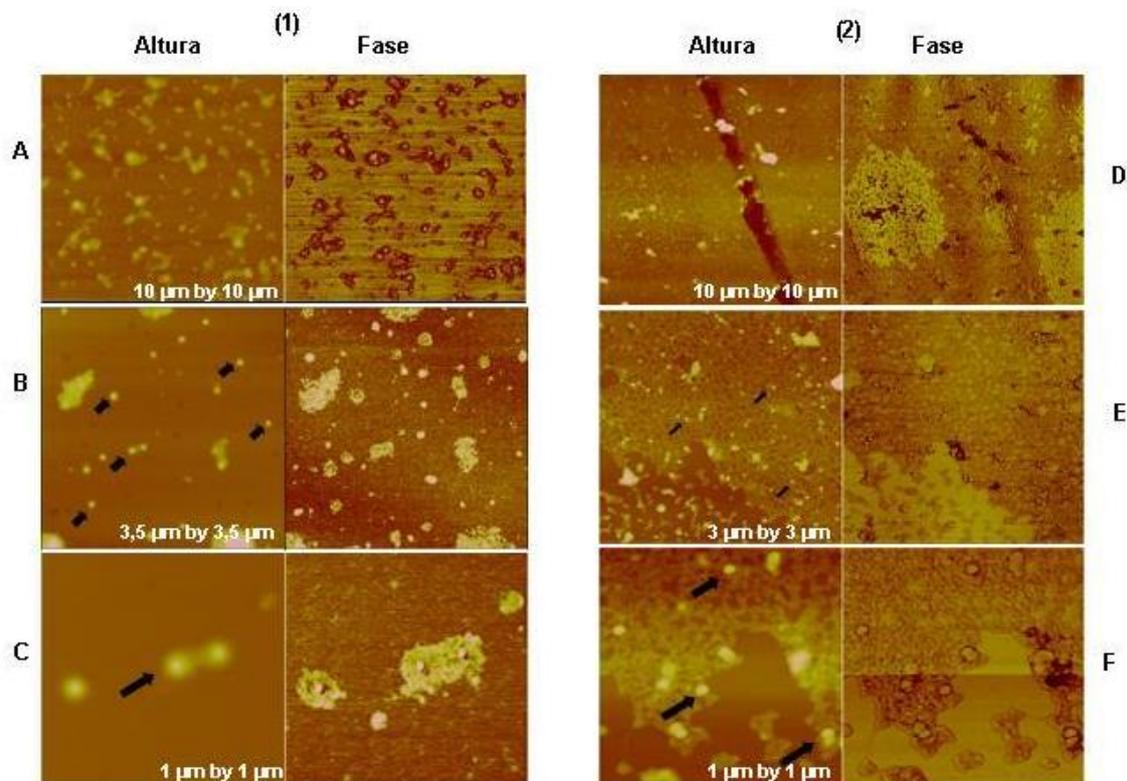


Figure 4: Imagens bidimensionais de AFM. Imagens obtidas empregando-se 3 μL do *Dengue virus 2* depositados em mica clivada a temperatura ambiente ($\sim 18^\circ\text{C}$) por 10', após lavado com água bidestilada, rapidamente, secas com jato de argônio e capturadas com sondas por "tapping mode", utilizando Nanoscope IIIa Multimolde AFM (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA). No painel da esquerda (1A, 1B e 1C) são observadas partículas virais purificadas e vírus individualizados indicado pelas setas nas figuras B e C. No painel da direita (2D, 2E e 2F) imagens de vírus não purificados cobertos por substâncias (sais) presentes no meio de cultura. As partículas podem ser visualizadas nas setas indicativas dos painéis B, C, E e F. Scan size: (A) 10.0 μm por 10.0 μm ; (B) 3.50 μm por 3.50 μm ; (C) 1.00 μm por 1.00 μm ; (D) 10 μm por 10 μm ; (E) 3.00 μm por 3.00 μm ; (F) 1.00 μm por 1.00 μm .

Com as diversas imagens capturadas foram realizadas medidas horizontais (L), diâmetro, pela técnica de AFM através de ferramentas do programa (“Section Analysis”). As partículas de DENV purificadas foram medidas obtendo diâmetro médio de $55\text{nm} \pm 10,22\text{nm}$ (figura 5).

Com a intenção de avaliar as partículas por outras metodologias foram feitas as medidas horizontais a partir das imagens, de altura (figura 6A) e fase (figura 6B), capturadas no painel 1C (figura 4), sendo utilizado a ferramenta de zoom na área demarcada (figura 6A) para proporcionar um aumento, onde são visualizadas duas partículas virais esféricas do DENV (figura 6C) e com diâmetro uniforme, com valores de 57 e 58 nanômetros.

Após descongelamento e preparação da amostra viral, conforme metodologia no item 4.4, e um período de observação e captura de imagens (~ 3 horas) à temperatura ambiente da sala (18°C), foi visualizada a exposição do ácido ribonucléico, RNA, no estado nativo, sem o uso de tampões ou calor, e a análise dos aspectos na topologia das partículas do *Dengue virus* foram feitas (figura 7). A liberação do RNA, que constitui o ácido nucléico componente do *Dengue virus*, ocorreu e foi observado através da circularização do mesmo por imagens de altura, fase e tridimensional (figura 7A e 7B), que se faz através de interações das regiões não-traduzidas 3' e 5' UTR. Na figura 7D, onde é visualizada uma imagem de circularização foi utilizada a ferramenta do programa “Section Analysis” em “Average” que apresenta como resultado a média dos traços dentro da área delimitada para medir a espessura do RNA, exposto da partícula viral, com 1,3 nm.

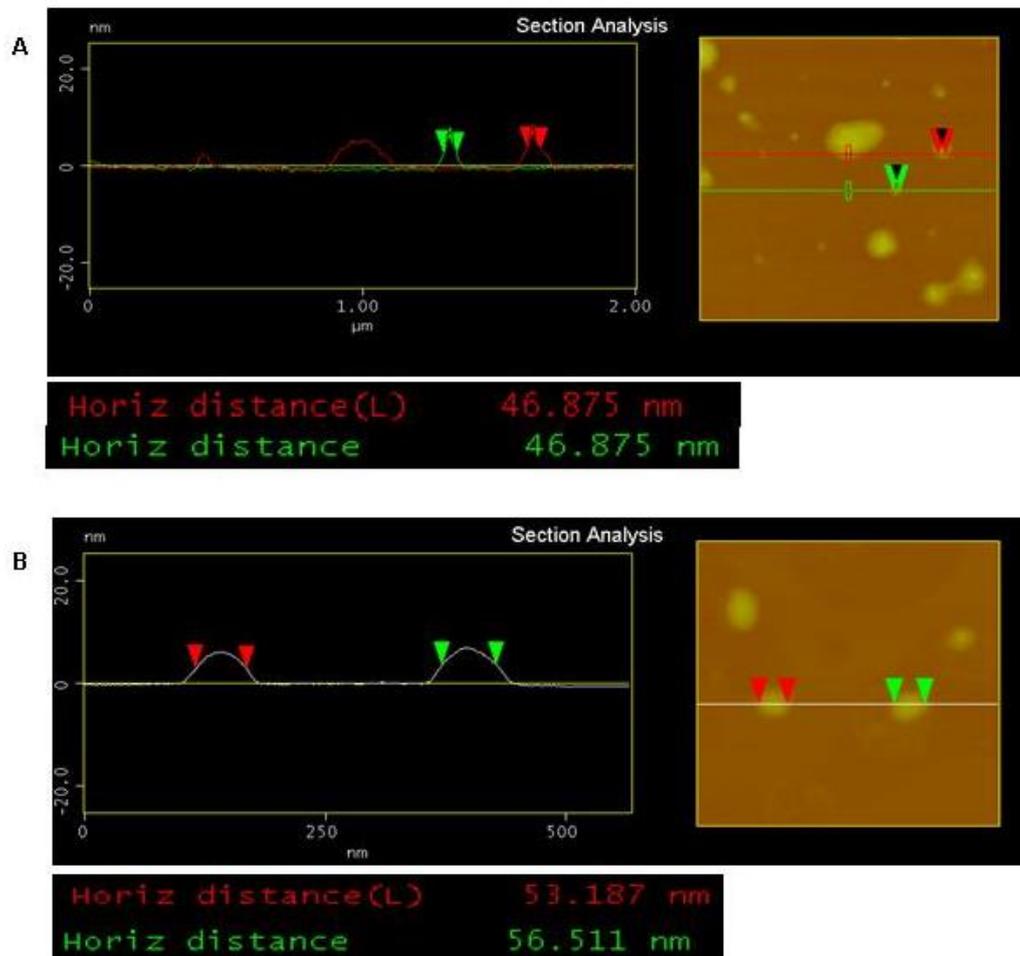


Figura 5: Medidas horizontais das partículas virais. Imagens obtidas empregando-se 3 μ L do *Dengue virus 2* purificado depositados em mica clivada a temperatura ambiente ($\sim 18^\circ\text{C}$) por 10', após lavado com água bidestilada, rapidamente, secas com jato de argônio e capturadas com sondas por "tapping mode", utilizando Nanoscope IIIa Multimolde AFM (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA). A - Partículas virais apresentam, relativamente, medidas similares com 46nm de diâmetro. B - *Dengue virus* com medidas e diâmetro semelhantes com 53 e 56nm (medidas horizontais de $55\text{nm} \pm 10,22$). Scan size: (A) 2.00 μm por 2.00 μm ; (B) 500nm por 500 nm.

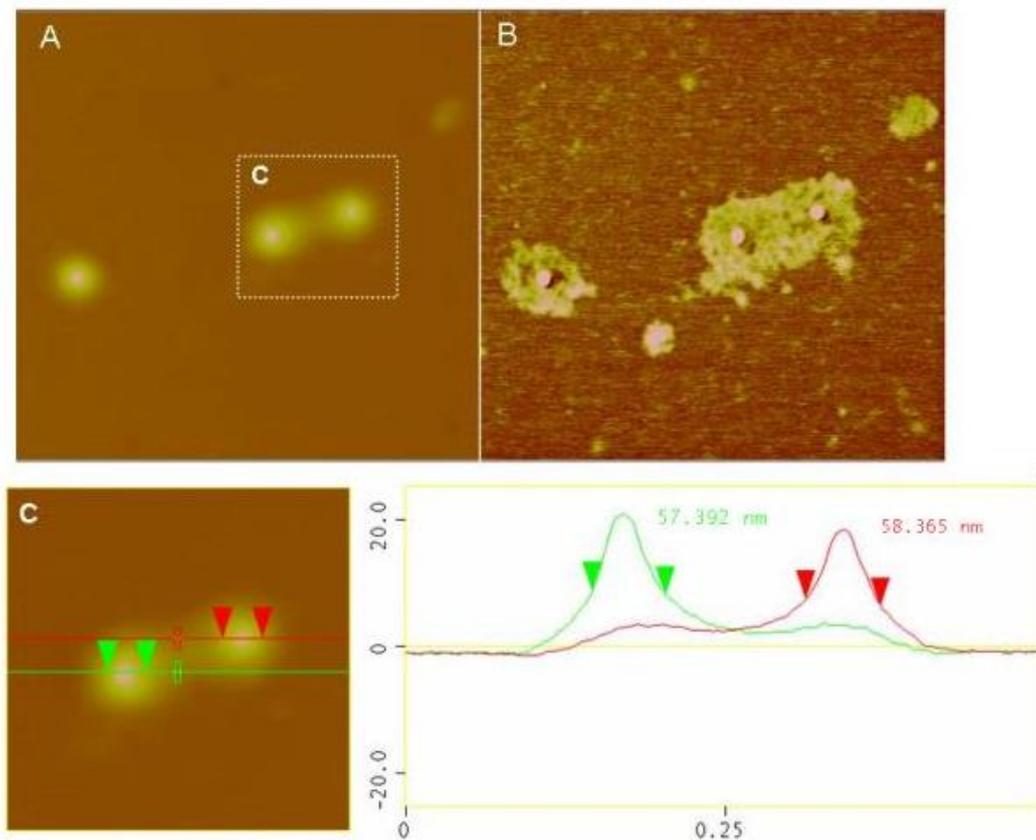


Figura 6: Imagens de altura, fase e zoom da partícula de Dengue virus. Foram feitas medidas horizontais do *Dengue virus 2* purificado empregando-se 3 μL do vírus depositado em mica clivada a temperatura ambiente ($\sim 18^\circ\text{C}$) por 10', após lavado com água bidestilada, rapidamente, secas com jato de argônio e capturadas com sondas por "tapping mode", utilizando Nanoscope IIIa Multimolde AFM (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA). A – Imagem de altura onde seleciona uma área com duas partículas virais onde foi realizado um zoom. B – Imagem de fase a qual privilegia a visualização da superfície da mica e a topologia do *Dengue virus*. C - Partículas do *Dengue virus*, após zoom, com medidas horizontais apresentando um diâmetro uniforme (de 57nm a 58nm). Scan size: (A) 1.0 μm por 1.0 μm ; (C) 500nm por 500nm.

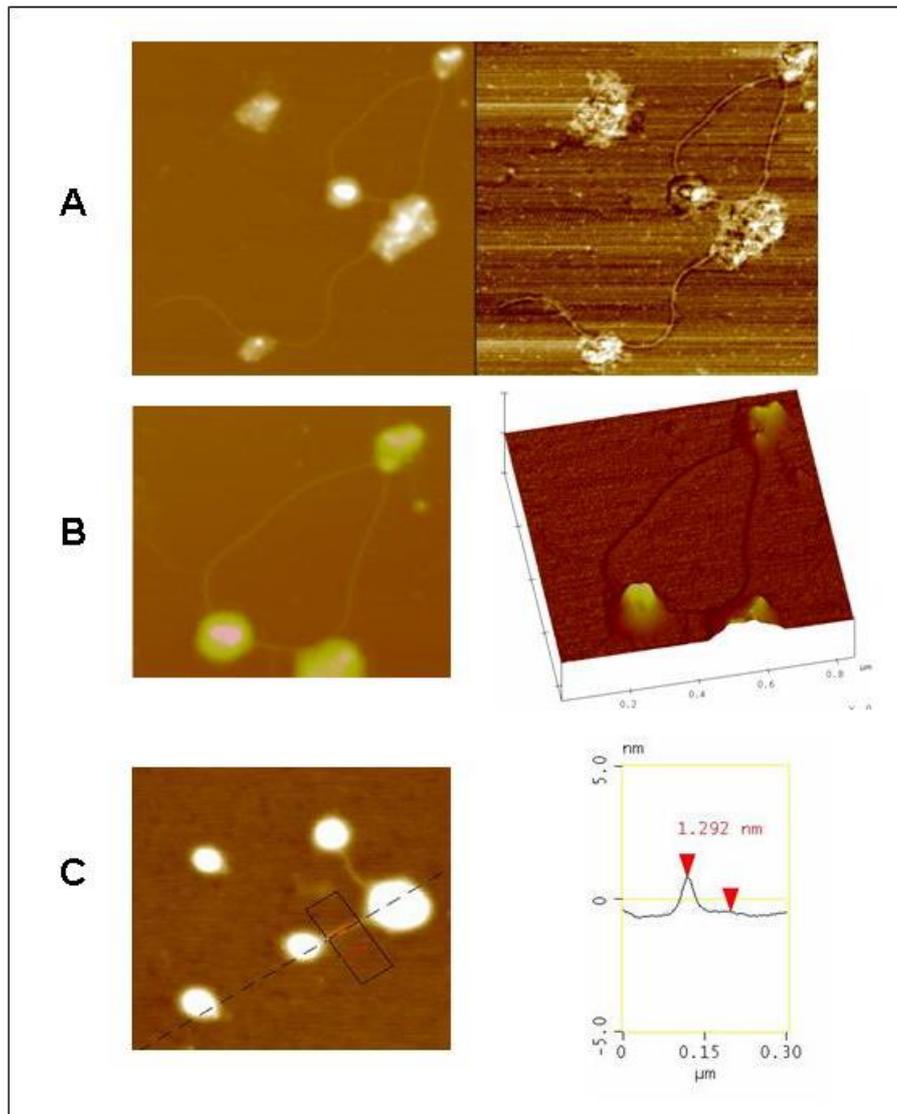


Figura 7: Circularização do RNA de altura, fase, com zoom, imagem tridimensional (3D) e medida da espessura do RNA. Foram obtidas imagens, por AFM, do *Dengue virus 2* purificado empregando-se 3 μL do vírus depositado em mica clivada a temperatura ambiente ($\sim 18^\circ\text{C}$) por 10', após lavado com água bidestilada, rapidamente, seca com jato de argônio e capturadas com sondas por "tapping mode", utilizando Nanoscope IIIa Multimolde AFM (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA). A – Imagem de altura e fase onde é visualizado a circularização do ácido nucléico entre as partículas virais. B – Imagens, com zoom e em 3D, da circularização do RNA com a visualização da topologia do *Dengue virus*. C – Circularização do RNA de *Dengue virus* com medidas em "average" apresentando uma espessura de 1,3 nm. Scan size: (A) 1.5 μm por 1.5 μm ; (B) 900nm por 900nm; (C) 300nm por 300nm.

5.3 – Determinação da via de inoculação e susceptibilidade a infecção por Dengue virus em diferentes linhagens de camundongos.

Camundongos BALB/c, com 2 semanas de idade, foram inoculados com $1,5 \times 10^4$ p.f.u. de *Dengue virus 2*. Os volumes de inoculação variaram, de acordo, com as vias de inoculação empregadas: I.C., inóculo de 20 μ L, I.P. de 200 μ L e I.V. de 50 μ L. Estes animais foram acompanhados, diariamente, e no 10^o dia p.i. somente os camundongos inoculados, por via I.C., apresentaram sinais clínicos de encefalite, ou seja, paralisia de membros posteriores, perda do equilíbrio, arqueamento do dorso, eriçamento dos pêlos, e conseqüente perda de peso comparado aos animais controles, inoculado com meio L -15, conforme mostrado na figura 8. Destes camundongos foram retirados o cérebro, pulmão, baço, fígado e sangue total. Os órgãos foram macerados e os sobrenadantes empregados na determinação do título do vírus. O vírus foi detectado somente no cérebro na concentração de $7,5 \times 10^3$ p.f.u./mL. Os camundongos inoculados pelas vias I.P. e I.V. não apresentaram sinais clínicos da doença.

Um estudo comparativo foi feito em camundongos BALB/c e C57Bl/6. Os camundongos de ambas as linhagens com idade de 2 semanas de idade foram inoculados com $1,5 \times 10^4$ p.f.u./0,02mL do *Dengue virus 2*, via I.C.. Em camundongos BALB/c, os primeiros sinais clínicos caracterizados por paralisia dos membros, perda do controle motor, dentre outros sinais, ocorreram no 7^o dia p.i.. Entre o 8^o e o 11^o dia p.i. os camundongos apresentaram paralisia, com redução de 30% do peso e o título de vírus detectado no cérebro foi de 9×10^3 p.f.u./mL (tabela 5) com mortalidade de 90% dos animais infectados até o 12^o dia p.i. (figura 9). Nos camundongos C57Bl/6, no 7^o dia p.i., um dos animais apresentava paralisia e 30% de redução de peso. Entre o 08^o e o 10^o dia p.i., 100% dos camundongos infectados que apresentaram paralisia morreram (figura 9). O título do vírus detectado no cérebro foi 2×10^4 p.f.u. / mL (tabela 5)

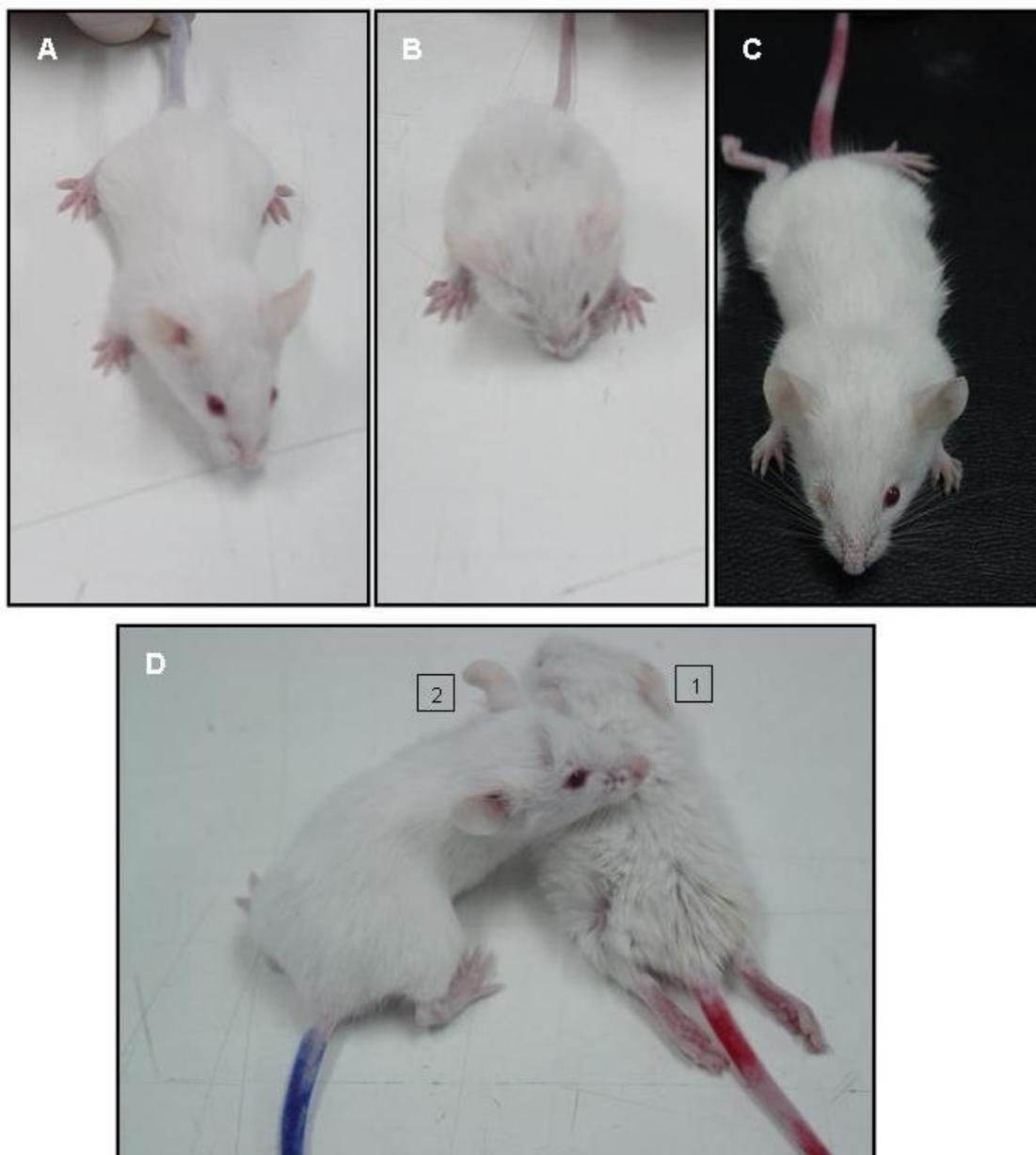


Figura 8: Sinais clínicos observados em camundongos BALB/c, com 2 semanas de idade, inoculados com $1,5 \times 10^4$ p.f.u., em um volume de $20\mu\text{L}$, via I.C., com *Dengue virus* 2. As fotografias evidenciam sinais apresentados em A – Camundongo controle inoculado com meio de cultura (L-15), B – animal com arqueamento do dorso, C - camundongo com cegueira no olho direito e paralisia e D – paralisia dos membros posteriores e piloereção do animal infectado (1) comparado ao controle (2).

Tabela 5. Determinação dos títulos de vírus (p.f.u./mL) em órgãos de camundongos BALB-c e C57Bl/6, infectados, via I.C ., com $1,5 \times 10^4$ p.f.u., em um volume de $20\mu\text{L}$, do *Dengue virus 2*.

	CÉREBRO ^a (p.f.u./mL)	FÍGADO	BAÇO	PULMÃO
BALB/c 8º dia p.i.	$9 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$	ND ^b	ND ^b	ND ^b
C57Bl/6 7º dia p.i.	$2 \times 10^4 \pm 10^4$	ND ^b	ND ^b	ND ^b

^a média \pm desvio padrão dos títulos de 3 camundongos de cada linhagem.

ND^b - não detectado.

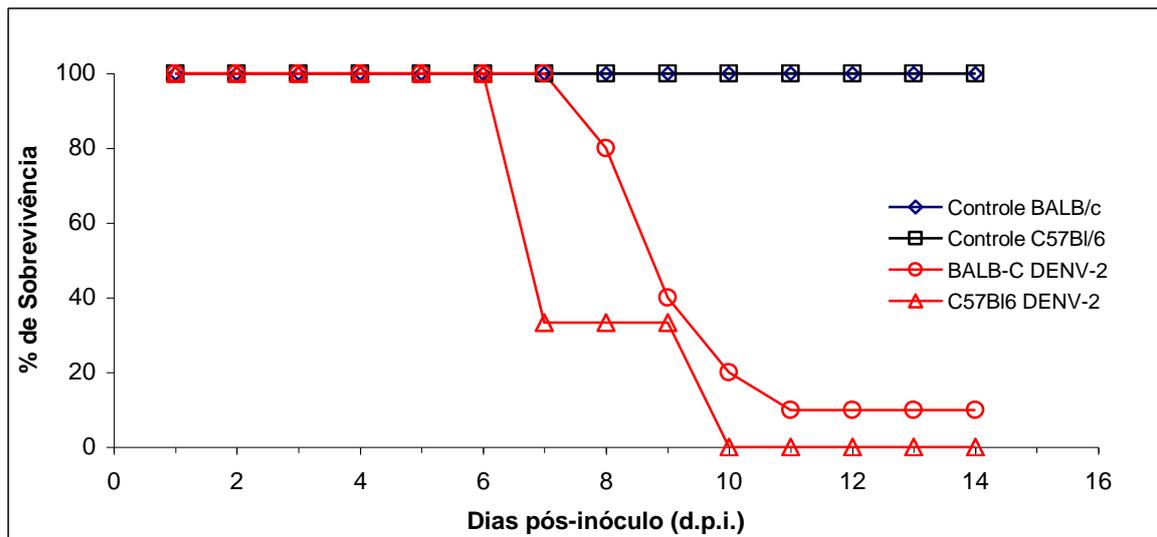


Figura 9: Curva de sobrevivência de camundongos BALB/c e C57Bl/6, com 02 semanas de idade, infectados com *Dengue virus 2*. Camundongos BALB/c (controle, n=3, losango) e C57Bl/6 (controle, n=2, quadrado) foram inoculados com 20µL de meio L-15 ou com $1,5 \times 10^4$ p.f.u./0,02mL, via I.C., do *Dengue virus 2* (BALB/c -círculo, n= 10 e C57Bl/6 - triângulo, n= 4).

5.4 - Virulência de amostras clínicas isoladas de pacientes com manifestações de febre clássica do dengue (FD) e febre hemorrágica do dengue (FHD).

5.4.1 – Virulência de diferentes sorotipos no modelo murino.

O objetivo foi avaliar a virulência do DENV em camundongos C57Bl/6, com 2 semanas, inoculados via I.C., com amostras isoladas de surtos ocorridos na região metropolitana de Belo Horizonte. Estas amostras foram isoladas a partir de soro de pacientes, com clínica sugestiva de FD e FHD.

Camundongos C57Bl/6, com 02 semanas de idade, foram infectados com 4×10^3 p.f.u., em volume de 20 μ L, por via I.C., da amostra de DENV-1 (109) isolada de paciente com FD. Nenhum dos animais inoculados apresentou sinais clínicos e nem perda de peso durante 20 dias p.i..

Camundongos C57Bl/6, com 2 semanas, foram inoculados com 4×10^3 p.f.u., em volume de 20 μ L, da amostra DENV-3 375(MG) genótipo I (Figueiredo *et al.*, 2008) isolada de paciente com FHD, e os animais apresentaram no 5º dia p.i., perda do equilíbrio, espasmos e tremores, evoluindo para paralisia dos membros posteriores entre o 6º dia e o 7º dia. No intervalo do 6º ao 7º dia p.i. todos os camundongos inoculados haviam morrido (figura 10).

Visando avaliar a virulência deste isolado DENV-3 375(MG) I, em camundongos adultos, foram feitas inoculações de camundongos C57Bl/6, com 5 semanas de idade, com 4×10^3 p.f.u./camundongo, via I.C.. Os camundongos apresentaram início dos sinais clínicos para encefalite e mortalidade a partir do 7º dia p.i. com mortalidade total até o 8º dia p.i. (figura 10).

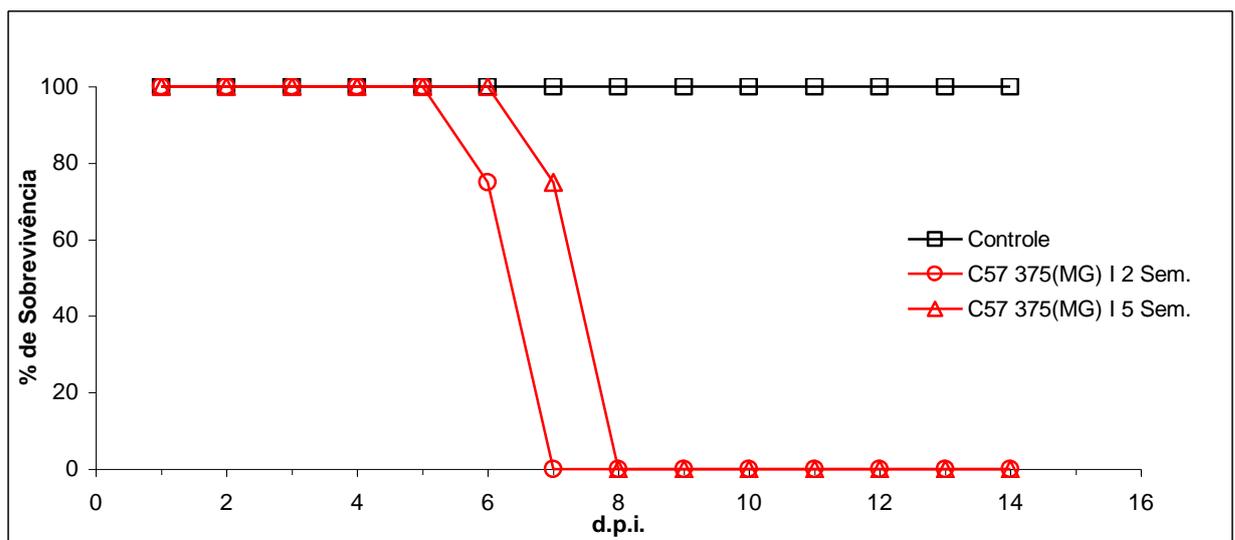


Figura 10: Curva de sobrevivência de camundongos C57BI/6, com 2 e 5 semanas, infectados com o *Dengue virus 3 375(MG) I*. Camundongos C57BI/6 de 2 semanas ou 5 semanas foram inoculados com 20 μ L de meio L-15 (controle, n=2, quadrado) ou 4 x 10³ p.f.u. com *Dengue virus 3 375(MG) I*, via I.C.. (n=4, 2 semanas=círculo; 5 semanas = triângulo).

Após verificar a mortalidade nos camundongos C56Bl/6 adultos, com o DENV-3 375(MG) I, inoculados via I.C., foi avaliada a dose dependência, fazendo-se a inoculação com diferentes concentrações do mesmo vírus. A dose empregada foi de 4×10^3 p.f.u. e 4×10^2 p.f.u., em volumes de 20 μ L, com um quatro animais para cada dose administrada nos animais infectados e três nos controles. Os camundongos inoculados com 4×10^3 p.f.u., apresentaram início dos sinais clínicos com tremores e espasmos intercalados entre o 5º e o 6º dia p.i., evoluindo para paralisia dos membros posteriores, arqueamento do dorso, sem resposta a estímulos (apáticos) e sem movimentação. No intervalo do 6º ao 8º dia p.i. todos os animais haviam morrido (Figura 11). Os animais inoculados com 4×10^2 p.f.u. apresentavam sinais de encefalite com perda do equilíbrio, no 7º dia p.i., espasmos e tremores intermitentes. Entre o 7º e o 9º dia p.i. todos os animais haviam morrido (Figura 11).

De forma a estabelecer se camundongos C57Bl/6 adultos eram susceptíveis a estes vírus em outras vias de inoculações, além da via I.C., camundongos C57Bl/6 foram inoculados com DENV-3 375(MG) I, via I.P. e I.V. com diferentes doses do vírus para avaliar possíveis sinais clínicos. Quatro camundongos C57Bl/6 foram inoculados via I.P., com 4×10^3 e 4×10^2 p.f.u., em volumes de 20 μ L, e foram empregados e três animais como controles. Estes camundongos inoculados não apresentaram nenhum dos sinais clínicos já descritos, até o 35º dia p.i.. Os camundongos C57Bl/6 inoculados via I.V., com a mesmas doses, também não apresentaram sinais clínicos até o 35º dia p.i.. Foram feitas ainda, inoculações, com as mesmas doses, pelas vias intradérmica (I.D.) ou subcutânea (S.C) com a amostra DENV-3 375(MG) I em camundongos para verificar se apresentariam sinais de encefalite. Os camundongos foram acompanhados por 20 dias p.i. estes animais permaneceram sem alterações para sinais clínicos.

Os animais inoculados com DENV-3 375(MG) I, nas 2 vias de inoculação, I.P. e I.V., foram reinoculados com 4×10^2 p.f.u. do mesmo vírus, via I.C., e a

ocorrência dos sinais clínicos foi acompanhada como a seguir. Camundongos reinoculados (n=4), via I.C. (I.C. pós I.P.), apresentaram sinais como tremores, espasmos e paralisia, entre o 7º e o 8º dia p.i., e dois animais moribundos foram sacrificados para retirada de órgãos e o soro foi obtido. No 9º e 10º dia p.i., os camundongos apresentaram sinais de encefalite, paralisia nos membros posteriores. No 11º dia p.i., os quatro camundongos haviam evoluído para o óbito. Os camundongos reinoculados (n=4), via I.C. após I.V., não apresentaram nenhum dos sinais para encefalite comparados aos controles, até o 7º dia p.i.. No 9º dia p.i., um dos animais apresentava encefalite e os demais permaneceram sem apresentar sinais clínicos. Assim, houve mortalidade de 100% e 25% nos reinoculados, via I.C. com o DENV-3 (I.C. pós I.P.) e nos camundongos reinoculados (I.C. pós I.V.), respectivamente.

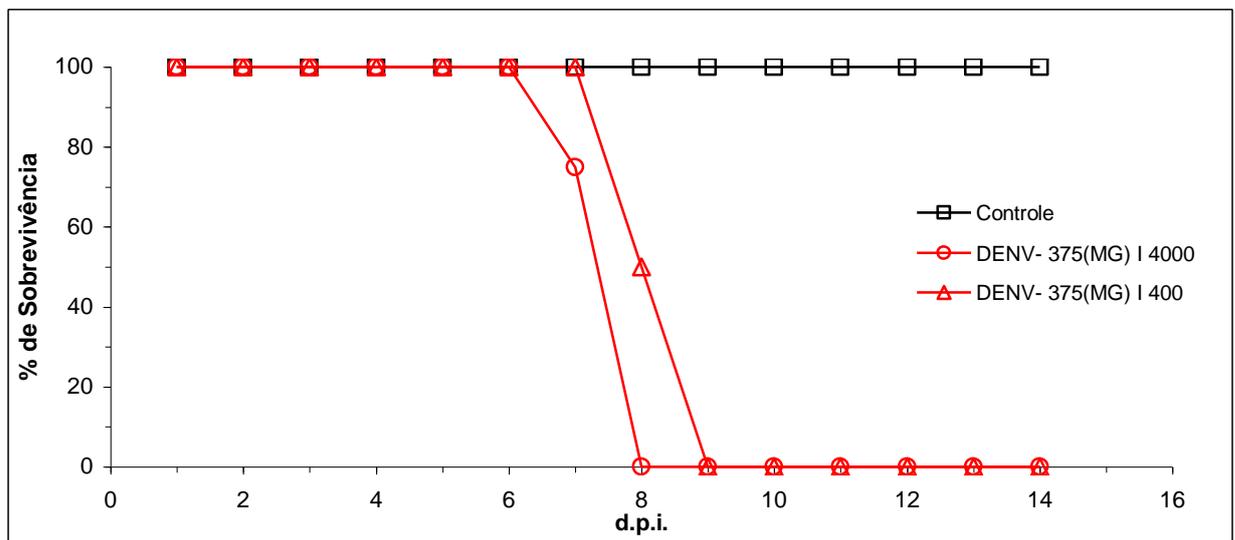


Figura 11: Virulência em camundongos C57Bl/6, com 5 semanas, infectados com 400 e 4000 p.f.u. do DENV-3 375(MG) I. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 20 μ L de meio L-15 (controle, n=3, quadrado) ou com 4 x 10³ p.f.u., via I.C., do *Dengue virus* 3 375(MG) I (n=4, círculo) ou 4 x 10² p.f.u. (n=4, triângulo).

Outras amostras de vírus isoladas de pacientes foram inoculadas em camundongos C57Bl/6 adultos. As amostras isoladas de pacientes *Dengue virus* 1 (109 - FD), (240 - FHD) e *Dengue virus* 3 25 (MG) e 375(MG) I foram inoculadas, por via I.C., na concentração de 4×10^2 p.f.u.. Os animais inoculados com DENV-3 25(MG) I apresentaram sinais de encefalite, perda do controle motor, tremores e espasmos, mas ainda apresentando movimentação no 6º dia p.i.. No 7º dia p.i. três animais apresentaram paralisia, eriçamento dos pêlos e não tinham movimentação e dois animais apresentaram os primeiros sinais com tremores e espasmos. Até o 8º dia p.i., todos os animais haviam morrido (figura 12).

Para a amostra de DENV-3 375(MG) I, com a mesma dose do vírus, o início dos sinais clínicos foi detectado no 7º dia p.i. com a morte ocorrendo até o 8º dia p.i. (figura 12). Os animais inoculados com a mesma dose de DENV-1 (109 - FD) e (240 - FHD) não apresentaram quaisquer sinais clínicos até o 30º dia p.i. (figura 12). Assim, nos animais inoculados com as amostras DENV-3 25(MG) e 375(MG) genótipo I ou nos animais inoculados com os isolados DENV-1 (109 e 240) houve mortalidade de 100 e zero por cento, respectivamente (figura 12).

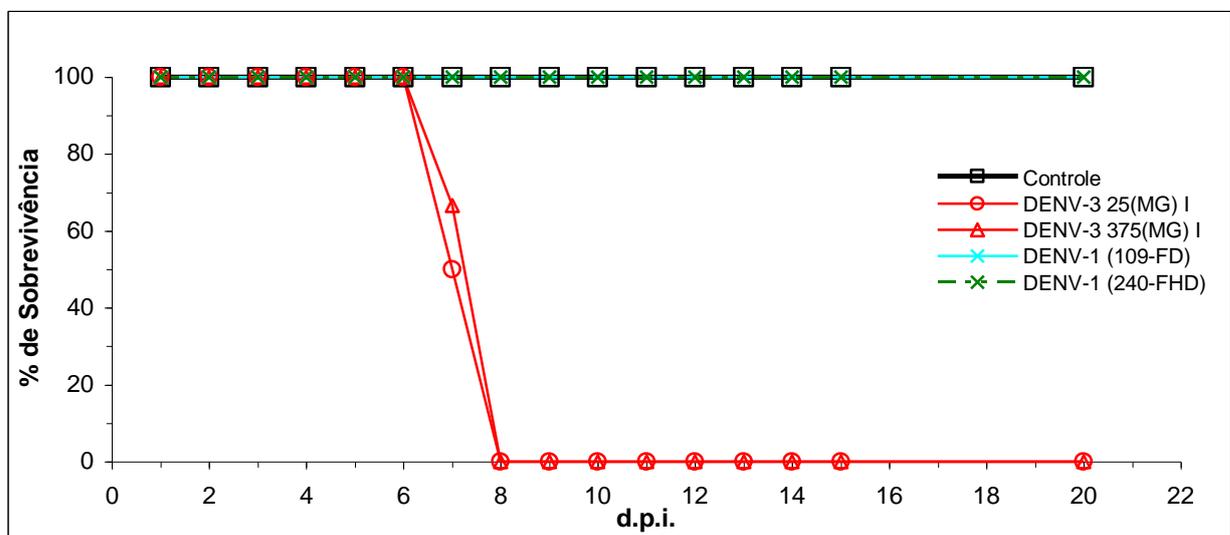


Figura 12: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6, com 6 semanas, infectados com diferentes amostras e sorotipos do *Dengue virus*. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 20µL de meio L-15 (controle, n= 6, quadrado) ou com 4×10^2 p.f.u., via I.C., com as amostras *Dengue virus* 3 25(MG) (n= 6, círculo), 375(MG) I (n= 6, triângulo) ou *Dengue virus* 1 (109 -FD) (n= 6, asterisco) ou (240 -FHD) (n= 6, asterisco).

5.4.2 – Avaliação das alterações no sangue periférico do modelo murino.

De forma a analisar as alterações hematológicas nos animais inoculados com DENV-3 25(MG) e 375(MG) genótipo I, no 7^o e 8^o dias p.i., foram feitas contagem de leucócitos, eritrócitos e calculados os índices hematimétricos. O sangue total foi coletado com anticoagulante (EDTA), após procedimento de anestesia dos animais, através da veia plexo-braquial. As tabelas 6 e 7 exibem os dados do eritrograma de camundongos inoculados com as amostras DENV-3 25(MG) e 375(MG) I. No que se refere à análise das hemácias e o cálculo dos índices hematimétricos não houve variação significativa entre os grupos de animais controles e inoculados com os *Dengue virus*.

Os camundongos inoculados apresentaram uma redução, estatisticamente significativa na contagem global de leucócitos, indicando uma leucopenia dos camundongos infectados (WBC= 1840 e 2180, respectivamente) em relação aos controles (WBC= 5966), com um ***p=0,0003 nos camundongos com *Dengue virus* 3 25(MG) e ***p=0,0004 para 375(MG) I (figura 13), no 8^o dia p.i..

Tabela 6. Eritrograma do sangue periférico de camundongos C57Bl/6 infectados, via I.C., com 4×10^2 p.f.u. do *Dengue virus 3 375(MG) I* e 25(MG) I.

Amostras	RBC $10^6/\text{mm}^3$	HGB g/dL	HCT (micro) %
Am 25(MG) I	$8,23 \pm 0,64$	$12,46 \pm 1,61$	$33,25 \pm 1,70$
Am 375(MG) I	$8,58 \pm 0,46$	$13,12 \pm 0,97$	35 ± 0
Controles	$7,76 \pm 0,99$	$11,7 \pm 0,96$	$31,66 \pm 3,05$

Os resultados se referem à média \pm desvio padrão obtidos de no mínimo 3 animais.

RBC = contagem de hemácias

HGB = dosagem de hemoglobina

HCT micr = micrphematócrito feito em microcentrífuga

Tabela 7. Índices do sangue periférico de camundongos C57Bl/6 infectados, via I.C., com 4×10^2 p.f.u. do *Dengue virus 3 375(MG) I* e 25(MG) I.

Amostras	VCM fl	HCM pg	CHCM g/dL
Am 25(MG) I	$45,56 \pm 0,46$	$15,92 \pm 0,81$	$35,12 \pm 1,84$
Am 375(MG) I	$46,2 \pm 0,79$	$25,94 \pm 1,43$	$34,4 \pm 3,51$
Controles	$47,36 \pm 0,64$	$15,13 \pm 0,87$	$31,96 \pm 2,02$

Os resultados se referem à média \pm desvio padrão obtidos de no mínimo 3 animais.

VCM = volume corpuscular médio

HCM = hemoglobina corpuscular média

CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média

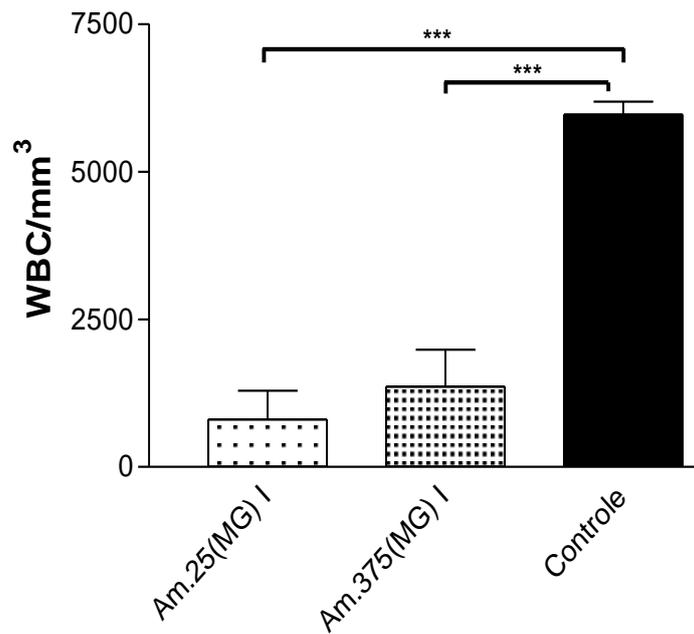


Figura 13: Contagem de leucócitos em camundongos C57Bl/6 inoculados, 6 semanas, com *Dengue virus 3 25(MG) e 375(MG) genótipo I*. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de 20 μ L do DENV-3 25(MG) e 375(MG) I, via I.C.. Entre o 7^oe 8^o dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de leucócitos. As análises obteve-se um valor de *** p=0,0003 para DENV-3 25(MG) (n=6) vs. controles (n=4) e um ** p=0,0004 para DENV-3 375(MG) I (n=6) vs. controle. Am=amostra.

Quanto ao número de linfócitos, os camundongos apresentaram uma linfopenia absoluta, significativa, com um $***p = 0,0005$ para as amostras DENV-3 25(MG) I (Linfócitos=1718) (figura 14) e com $***p < 0,0001$ DENV-3 375(MG) I (Linfócitos=1581) quando comparados com os controles (Linfócitos=5122) (figura 14). No que se refere à análise das hemácias e o cálculo dos índices hematimétricos não houve variação significativa entre os grupos de animais controles e inoculados com os *Dengue virus*.

Os granulócitos, células componentes dos leucócitos, representado, principalmente, por neutrófilos foram analisados. Os granulócitos apresentaram uma diminuição significativa com um $*p = 0,012$ para as amostras de DENV-3 25(MG) (granulócitos=25) e com $*p = 0,014$ DENV-3 375(MG) I (granulócitos=28) (figura 15) quando comparados com os camundongos controles (granulócitos=127).

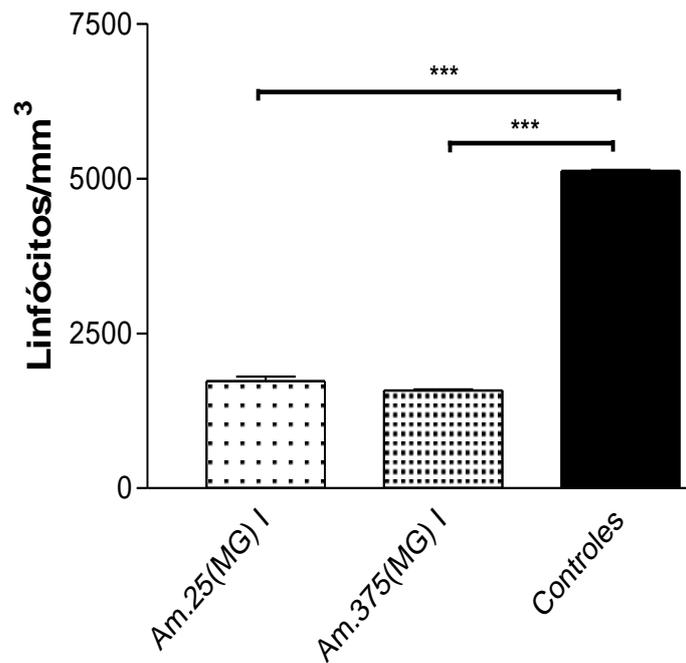


Figura 14: Contagem de linfócitos em camundongos C57Bl/6, 6 semanas, inoculados com *Dengue virus 3 25(MG) ou 375(MG) genótipo I*. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de $20\mu\text{L}$ do DENV-3 25(MG) ou 375(MG) I, via I.C.. Entre o 7^o e 8^o dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de linfócitos. **Nas análises** obteve-se um valor de *** $p= 0,0005$ para DENV-3 25(MG) I vs. controles e um *** $p< 0,0001$ para DENV-3 375(MG) I vs. controle. Am=amostra.

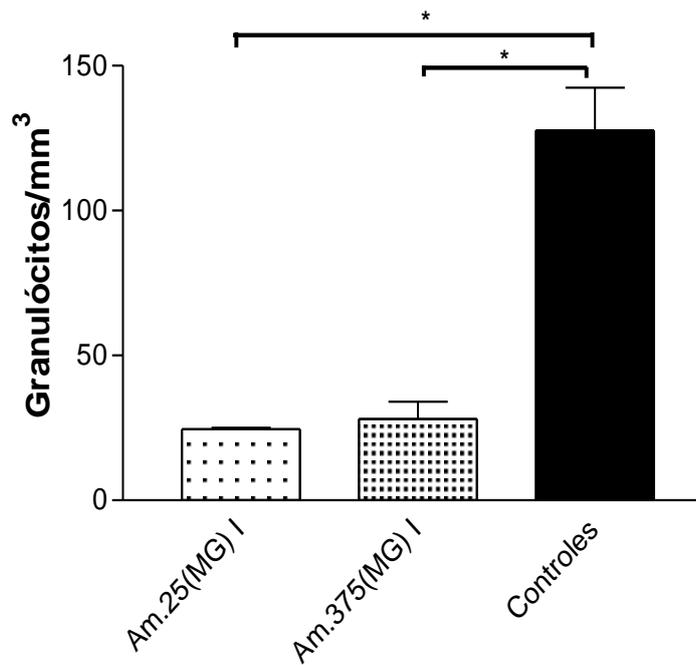


Figura 15: Contagem de granulócitos em camundongos C57Bl/6, 6 semanas, inoculados com *Dengue virus 3 25(MG)* ou *375(MG)* genótipo I. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de $20\mu\text{L}$ do *Dengue virus 3 25(MG)* ou *375(MG)* I, via I.C.. No 8º dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de linfócitos. Nas análises obteve-se um valor de $* p= 0,012$ para DENV-3 25(MG) vs. controles e um $*p= 0,014$ para DENV-3 375(MG) I vs. controles. Am=amostra.

5.4.3 – Cinética de infecção na análise do sangue periférico do modelo murino.

Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com *Dengue virus* 3 375(MG) I, via I.C., com o objetivo de avaliar, através de uma cinética, a evolução dos sinais clínicos. Estes camundongos foram sacrificados no segundo, quarto e sexto dia p.i. em grupos de seis camundongos para detectar o título viral e a contagem de células do sangue periférico.

No segundo dia p.i., não houve quaisquer alterações e/ou sinais clínicos nos camundongos inoculados com o DENV-3 375(MG) I. Para as análises de células, o sangue total deste grupo foi coletado com EDTA. Nas análises das células leucocitárias após 48 horas foi encontrada uma diminuição significativa para o número de leucócitos com um $^{**}p < 0,01$, conforme observado no total de leucócitos (WBC= 5133) comparados aos controles (WBC=7883) (figura 16). A contagem de linfócitos (Linfócitos= 4300) apresentou redução estatisticamente significativa ($^{**}p < 0,01$) comparado ao sangue total dos controles (figura 17). A contagem global de leucócitos, no quarto dia p.i., foi de 2225 células, com uma diferença estatisticamente significativa, comparados aos controles, com valor de $^{***} p < 0,001$, evidenciando um decréscimo superior a 50% comparados aos infectados, com 48 horas, com $^{**} p < 0,01$ (figura 16). Contudo, na análise de linfócitos, no 4ºd.p.i., foi detectada uma significativa diminuição (Linfócitos= 1685) com um $^{***} p < 0,001$ (figura 17). Esta diferença estatística, para linfócitos, permanece significativa ($^{**}p < 0,01$), quando comparamos os animais infectados entre os 2º e 4º dias p.i., e ainda entre o 2º e 6º dias p.i. (figura 17). No sexto dia p.i., os camundongos apresentaram uma diminuição significativa com $^{***} p < 0,001$, com contagem de leucócitos (WBC= 1766), quando comparados aos controles (WBC= 7883) com redução de 78% (figura 16). Os valores totais de leucócitos destes animais comparados aos inóculos no 2º e 4º dias p.i., exibem uma leucopenia com um $^{**} p < 0,01$ (figura 16). A linfopenia absoluta (Linfócitos= 1400) foi mantida com um valor de $^{***} p < 0,001$, conforme figura 17.

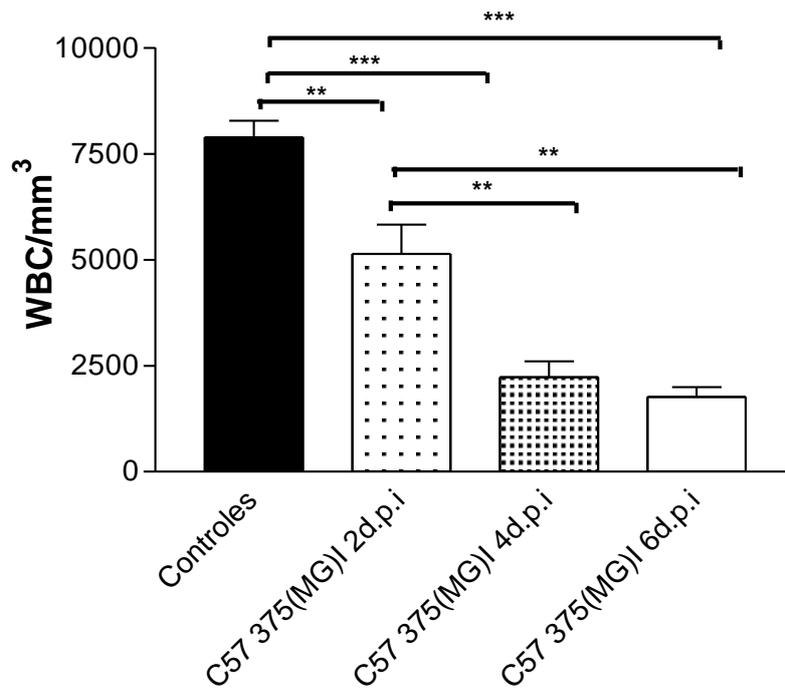


Figura 16: Cinética de leucopenia em camundongos C57Bl/6 inoculados com *Dengue virus 3 375(MG) genótipo I*: contagem de leucócitos. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de 20 μ L do *Dengue virus 3 375(MG) I*, via I.C.. No 2^o, 4^o e 6^o dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de leucócitos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma 3, ANOVA com teste Newman-Keuls, obtendo um valor de **p < 0,01, no 2^o dia p.i., para DENV-3 375(MG) I vs. controles, ***p < 0,001, no 4^o dia p.i., para DENV-3 375(MG) I vs. controles e um *** p < 0,001, no 6^o dia p.i., para DENV-3 375(MG) I vs. controles e ainda com ** p < 0,01, leucopenia significativa, entre os inóculos DENV-3 375(MG) I 2^o d.p.i. vs. DENV-3 375(MG) I 4^o d.p.i. e vs. DENV-3 375(MG) I 6^o d.p.i..

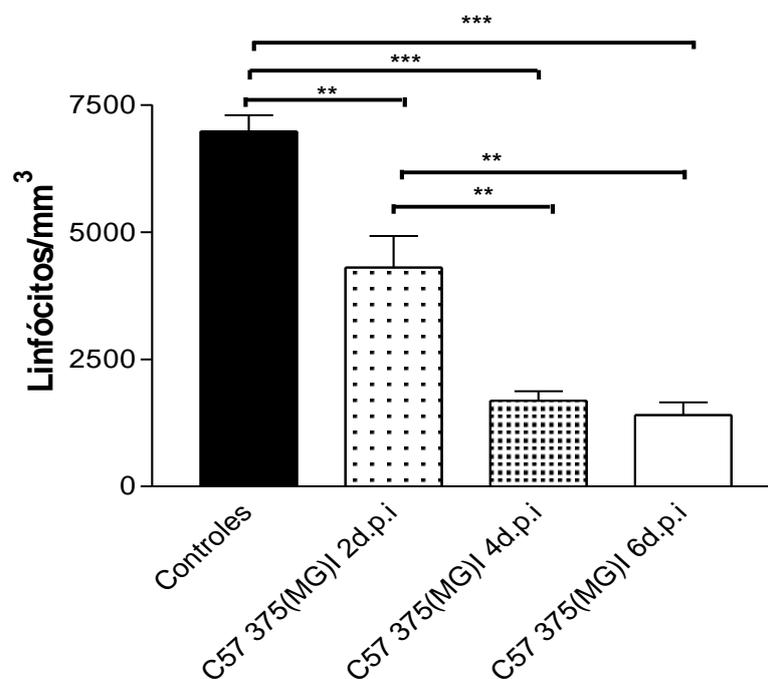


Figura 17: Cinética de linfopenia em camundongos C57Bl/6 inoculados com *Dengue virus 3 375(MG) genótipo I*: contagem de linfócitos. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de $20\mu\text{L}$ do *Dengue virus 3 375(MG) I*, via I.C.. No 2º, 4º e 6º dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de linfócitos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma 3, ANOVA com teste Newman-Keuls, obtendo um valor de $**p < 0,01$, no 2º dia p.i., para DENV-3 375(MG) I vs. controles, $*** p < 0,001$, no 4º dia p.i., para DENV-3 375(MG) I vs. controles e um $*** p < 0,001$, no 6º dia p.i., para DENV-3 375(MG) I vs. controles e ainda um $** p < 0,01$, significativo, entre os inóculos DENV-3 375(MG) I 2º d.p.i. vs. DENV-3 375(MG) I 2º d.p.i. e vs. DENV-3 375(MG) I, no 6º d.p.i..

5.4.4 – Títulos de vírus nos órgãos dos camundongos: cinética de infecção

No 2º dia p.i., os órgãos extraídos (cérebro, pulmões, fígado e baço) foram titulados, por ensaio de placas, e não foi detectada a presença de vírus em nenhum dos órgãos. O vírus foi detectado, no 4º dia p.i., no cérebro, dos camundongos com um título de 3×10^3 p.f.u./mL. No entanto, não houve formação de placas virais detectáveis nos demais órgãos analisados, como também, não houve viremia sérica (tabela 8). No 6º dia p.i., os primeiros sinais clínicos para encefalite já haviam iniciado e os camundongos foram sacrificados. O título viral nos órgãos e no plasma destes camundongos foi analisado, obtendo-se um título de 2×10^6 p.f.u./mL no cérebro, não houve viremia detectável e os demais órgãos não apresentaram placas virais (tabela 8).

Tabela 8. Cinética de infecção de vírus por título viral, em camundongos C57Bl/6 infectados, via i.c., com *Dengue virus* 3 375(MG) I: determinação do título (p.f.u./mL) em órgãos e sangue.

Camundongos C57Bl/6, inoculados com 4×10^2 p.f.u.	CÉREBRO ^a (p.f.u./mL)	FÍGADO	BAÇO	PULMÃO	VIREMIA
02 dias p.i. (n=3)	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
04 dias p.i. (n=3)	$3 \times 10^3 \pm 1,7 \times 10^3$	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
06 dias p.i. (n=3)	$2 \times 10^6 \pm 10^6$	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b

^a média \pm desvio padrão dos títulos de 3 camundongos de cada linhagem.
 ND^b - não detectado

5.5 - Estudo comparativo da virulência de amostras de DENV-3 375(MG) genótipo I (Figueiredo et al., 2008) e Dengue virus 3 64(PI) genótipo III (segundo, Lanciotti et al., 1994) isolados de pacientes.

5.5.1 – Caracterização das amostras de DENV-3 64(PI) genótipo III e 375(MG) genótipo I.

5.5.1.1-Alinhamento de nucleotídeos e determinação das diferenças

Como a amostra DENV-3 375(MG) I apresentou características de virulência no modelo empregado de inoculação via I.C. em camundongos, foi utilizado uma amostra isolada em epidemia do Piauí para estudos comparativos. A amostra isolada no Piauí foi agrupada como do genótipo III. As seqüências dos genes C e prM e da região 5' não-traduzida dos *Dengue virus* 3 375(MG) I e 64(PI) III foram obtidas e compreendem 1182 nt. Estas seqüências foram alinhadas utilizando o método "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering" – Multalign (Corpet, 1998).

A figura 18 mostra as duas seqüências referente aos genes C e prM alinhados assinalando as bases grafadas, em vermelho, que indicam diferenças nucleotídicas entre as amostras estudadas. Apesar de as amostras pertencerem ao mesmo sorotipo de DENV foram detectadas algumas alterações de nucleotídeos que resultaram, de acordo com Lanciotti e colaboradores (1994), no seu agrupamento em genótipos I (amostras do sudeste Asiático) e genótipo III (África, Sri-Lanka e Índia) do *Dengue virus* 3 375(MG) e 64(PI), respectivamente.

```

1
64PI AAGCTTGCTT ACGTCAGTGC TAACAGTTTT TTATTAGAGA GCAGATCTCT GATGAACAAC CAACGGAAGA AGACGGGAAA ACCGTCTATC AATATGCTGA AACCGGTGAG AAACCGTGTG
375MG .....ACGT.....G.....

121
64PI TCAACTGGAT CACAGTTGGC GAAGAGATTC TCAAAGGAC TGCTGAACGG CCAGGGACCA ATGAAATTGG TTATGGCGTT CATAGCTTTC CTCAGATTTT TAGCCATTCC ACCAACAGCA
375MG .....G...T.....A.....T.....

241
64PI GGAGTTTGG CTAGATGGGG AACCTTCAAG AAGTCGGGGG CCATTAAGGT CCTGAAAGGC TTCAAGAAGG AGATCTCAA CATGCTGAGC ATATCAACA AACGAAAAA GACATCGCTC
375MG .....C.....T...T...T.....TT.A.....T.....

361
64PI TGCTCATGA TGATATTGCC AGCAGCACTT GCTTCCACT TGAATTCACG AGACGGAGAG CCGCGCATGA TTGTGGGAA GAATGAAAGA GGAAATCCC TACTTTTTAA GACAGCTCT
375MG .....G..A...A.....A.....T.....

481
64PI GGAATTAACA TGTGCACACT CATAGCCATG GACTTGGGAG AGATGTGTGA TGACACGGTC ACTTACAAAT GCCCCACAT TACCGAAGTG GAACTGAAG ACATTGACTG CTGGTGCAAC
375MG .....C.....T.....G.....

601
64PI CTTACATCAA CATGGGTGAC TTAGCGAACG TGCAATCAAG CCGGAGAGCA TAGACGCGAC AAGAGATCAG TGGCGTTAGC TCCCCATGTC GGCATGGGAC TAGACACACG CACCCAAACC
375MG .....G.....T...A.....T.....T.....G.....T.....

721
64PI TGGATGTCGG CTGAAGGAGC TTGGAGGCAA GTCGAGAAGG TAGAGACATG GGCCCTTAGG CATCCAGGGT TCACCATACT AGCCCTATTT CTGCCCATT ACATAGGCAC ATCCTTGACC
375MG .....A.....C.....T.....

841
64PI CAGAAGGTAG TTATTTTAT ACTACTAATG CTGGTCACCC CATCCATGAC AATGAGATGT GTGGGAGTAG GAAACAGAGA TTTTGTGGAA GGTCTATCAG GAGCTACGTG GGTGACGTG
375MG .....A..G.....T.....T.....C.....T.....C.....G.....C.....

961
64PI GTGCTCGAGC ACGGAGGGTG TGTGACTACC ATGGCTAAGA ACAAGCCAAC GTTGGATATA GAGCTTCAGA AGACCGAGGC CACCCAATTG GCGACCCTAA GGAAGCTATG CATTGAGGGG
375MG .....T.....C...C...C.....C.....A

1081
64PI AAAATTACCA ACATAACAAC TGAATCAAGA TGTCCTACCC AAGGGGAAGC GGTTTTGCCT GAGGAGCAGG ACCAGAACTA CGTGTGTAAG CATAACATAG TA
375MG .....C.....C.....A...A.....G
1182

```

Figura 18: Alinhamento de nucleotídeos, dos genes C e prM e da região 5' não-traduzida com 1182nt, das amostras Dengue virus 3 375(MG) genótipo I e Dengue virus 3 64(PI) genótipo III. Diferenças de nucleotídeos exibido, na região gênica analisada, entre as amostras de *Dengue virus* sorotipo 3, agrupando as amostras em diferentes genótipos de acordo com Lanciotti e colaboradores (1994).

5.5.2 – Diferenças de virulência das amostras na inoculação dos *Dengue virus 3*, no modelo murino.

Os resultados demonstram que o isolado humano DENV-3 375(MG) I possui um virulência diferenciada comparado a outros isolados inoculados dos DENV avaliados, sendo semelhante a amostra DENV-3 25(MG) I. Com o intuito de verificar diferenças entre as amostras do DENV-3, de surtos com origem geográfica distintas, foram inoculados camundongos C57Bl/6, via I.C., com 4×10^2 p.f.u. com as amostras DENV-3 375(MG) I e DENV-3 64(PI) III.

Confirmando os dados anteriores, os animais com DENV- 3 375(MG) I apresentaram os sinais de encefalite, já descritos, e mortalidade de 100%, entre o 7º e o 8º dia p.i. (figura 19). Já os animais inoculados com amostra DENV-3 64(PI) III não apresentaram sinais clínicos, e não houve mortalidade neste grupo (figura 19). Para estabelecer o título viral nos órgãos dos animais inoculados com ambas as amostras, os cérebros e pulmões foram processados e o sobrenadante foi implantado em placas de 6 poços para titulação. A presença do vírus foi detectada somente nos cérebros de camundongos com DENV-3 375(MG) I, com um título de 2×10^6 p.f.u./mL, sendo que nos pulmões não houve detecção de vírus. Nos cérebros e pulmões de animais com o DENV-3 64(PI) III não houve detecção de partículas virais (tabela 9).

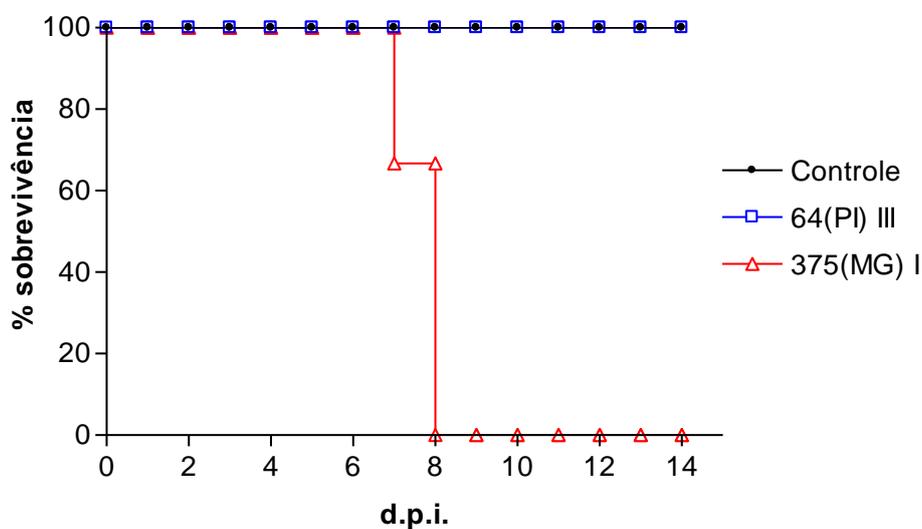


Figura 19: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6 adultos, com 6 semanas, infectados com duas amostras do Dengue vírus 3 de diferentes genótipos. Camundongos C57Bl/6 controles foram inoculados com 20µL de meio L-15 (n=4, quadrado preto) ou com 4×10^2 p.f.u., via I.C., com as amostras 375 (MG) genótipo I (n=6, triângulo vermelho) e 64(PI) genótipo III (n=6, quadrado vermelho).

Tabela 9. Dosagem de vírus por título (p.f.u./ml) nos órgãos de camundongos C57Bl/6 infectados, via I.C., com *Dengue vírus 3* no 8º d.p.i., com as amostras DENV- 3 64(PI) III e 375(MG) I.

Camundongos C57Bl/6 inoculados com 4×10^2 p.f.u./camundongo do DEN-3.	CÉREBRO ^a (p.f.u./ml)	PULMÕES
64(PI) genótipo III	ND ^b	ND ^b
375(MG) genótipo I	$2 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$	ND ^b

^a média \pm desvio padrão dos títulos de 3 camundongos de cada linhagem.
^b ND^b - não detectado

Para avaliar as possíveis alterações no sangue periférico destes animais inoculados com os diferentes vírus, foi feita a contagem total de leucócitos, linfócitos e neutrófilos (figuras 20, 21 e 22). O sangue total dos animais foi colhido (ver subitem 4.5.2) depois de anestesiados pelo plexo-braquial e foi verificado nos animais inoculados com a amostra DENV- 3 375(MG) I uma diminuição significativa no número total de leucócitos (W.B.C=3375) com $**p=0,0047$, como já visto no 6º d.p.i., quando comparado aos controles (W.B.C=10.000) (figura 20). Quando foi analisada a contagem de leucócitos em animais com DENV- 3 64(PI) III não foi verificada leucopenia comparado com os controles. A comparação da global de leucócitos, entre os animais inoculados com as amostras de DENV-3 mostrou uma diferença estatística com $* p=0,017$ (figura 20). Nas análises para contagem de linfócitos animais inoculados com DENV-3 375(MG) I apresentaram uma linfopenia absoluta, significativa, com um valor de $** p=0,0041$ comparado aos linfócitos dos animais controle (figura 21). Houve também uma diminuição relevante ($* p=0,014$) de linfócitos quando comparados os animais inoculados com DENV-3 375(MG) I e DENV-3 64(PI) III (figura 21).

Como em humanos durante a infecção por dengue ocorre a redução do número de neutrófilos no sangue periférico, foi feita também a contagem do número absoluto de neutrófilos, verificando-se uma redução significativa com um $*p= 0,048$, indicando uma neutropenia, entre os camundongos inoculados (Neutrófilos=266) com DENV-3 375(MG) I comparados aos controles (Neutrófilos=889). Como demonstra o gráfico ocorre também uma redução destas células quando comparados os animais inoculados com DENV-3 375(MG) I (Neutrófilos=266) e DENV-3 64(PI) III (Neutrófilos=971) (figura 22).

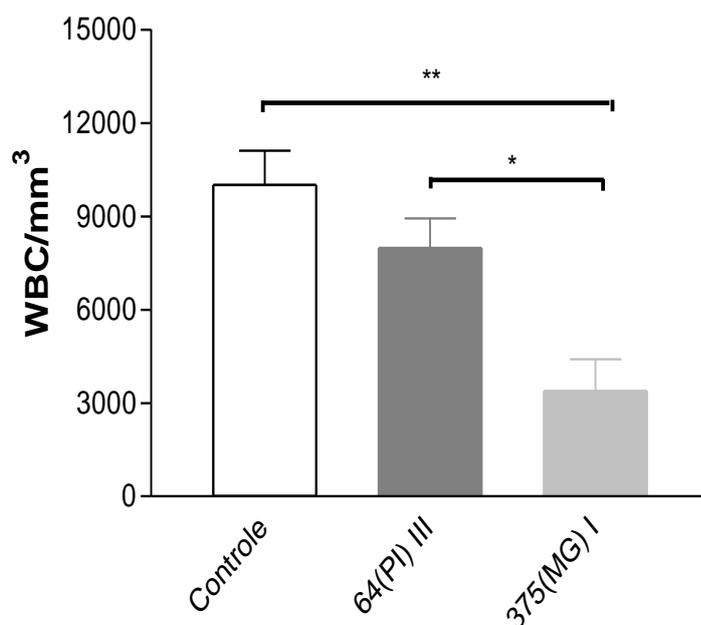


Figura 20: Contagem de leucócitos totais em camundongos C57Bl/6 inoculados com amostras Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou 64(PI) genótipo III. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de 20 μ L do *Dengue virus 3 375(MG) I* ou 64(PI) III, via I.C.. No 8^o dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de leucócitos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma 3, através do teste *t* de Student's, obtendo um valor de ** $p=0,0047$, nos camundongos C57Bl/6 com *Dengue virus 3 – 375(MG) I* vs. controles e um * $p= 0,017$, em camundongos com *Dengue virus 3 – 375(MG) I* vs. camundongos com *Dengue virus 3 – 64(PI) III*.

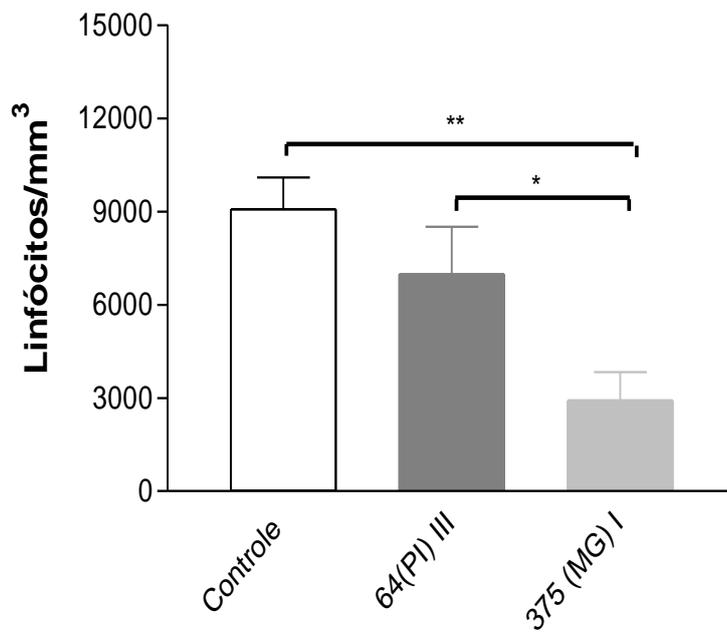


Figura 21: Contagem de linfócitos em camundongos C57Bl/6 inoculados com amostras Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou 64(PI) genótipo III. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de 20 μ L do *Dengue virus* 3 375(MG) I ou 64(PI) III, via I.C.. No 8^o dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de linfócitos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma 3, através do teste *t* de Student's, obtendo um valor de ** $p=0,0041$, nos camundongos C57Bl/6 com *Dengue virus* 3 – 375(MG) I vs. controles e um * $p=0,014$, em camundongos com *Dengue virus* 3 - 375(MG) I vs.camundongos com *Dengue virus* 3 – 64(PI) III.

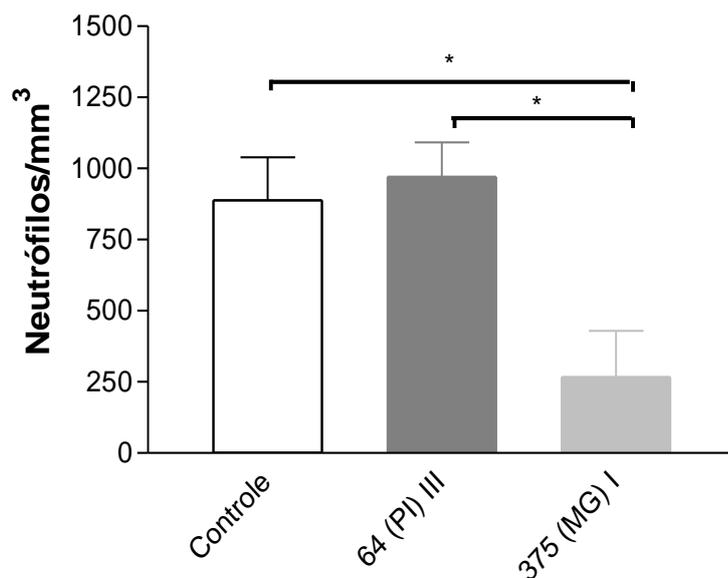


Figura 22: Contagem de neutrófilos em camundongos C57Bl/6 inoculados com amostras Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou 64(PI) genótipo III. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de $20\mu\text{L}$ do Dengue virus 3 375(MG) I ou 64(PI) III, via I.C. No 8º dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de neutrófilos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma 3, através do teste *t* de Student's, obtendo um valor de * $p= 0,048$, nos camundongos C57Bl/6 com *Dengue virus 3 – 375(MG) I* vs. controles e um * $p=0,025$, em camundongos com *Dengue virus 3 - 375(MG)* vs. camundongos com *Dengue virus 3 – 64(PI) III*.

Após a observação das alterações dos sinais clínicos, mortalidade e da contagem de leucócitos no grupo de animais com o DENV-3 375(MG) I, foi feita a análise do acometimento e o grau das lesões no cérebro dos camundongos infectados foi estudado. Os animais foram sacrificados e os cérebros recolhidos, incluídos em parafina, e corados por hematoxilina e eosina, para análises histopatológicas (figura 23, C-F). Ao mesmo tempo foram sacrificados os animais inoculados com o DENV-3 64(PI) III que não apresentaram sinais clínicos após a infecção (figura 23, G e H). As áreas fotografadas são representativas dos aspectos observados em todos os animais examinados por grupo.

Nas microfotografias dos cérebros dos animais inoculados com DENV-3 375(MG) I foi observada uma meningoencefalite intensa e difusa (C e E), com infiltrado inflamatório predominante de mononucleares acompanhado de intensas alterações vacuolares e degenerativas do córtex cerebral (setas abertas). No quadro F (seta) são observadas áreas sugestivas de morte celular por apoptose. Há áreas de reatividade vascular com vasculite intensa (D e F, cabeças de seta). Já no quadro E (seta larga) é observado edema de meninges de grau acentuado. As fotomicrografias (A e B) exibem cortes histológicos do cérebro de animais sem alterações significativas (controles).

As microfotografias de meninges e do encéfalo de animais inoculados com DENV-3 64(PI) III apresentam discretas alterações. No quadro G (seta larga) é observado uma meningite discreta, edema com descolamento focal das meninges, congestão em vasos meníngeos e discreta presença de células mononucleares (cabeça de seta, quadro H).

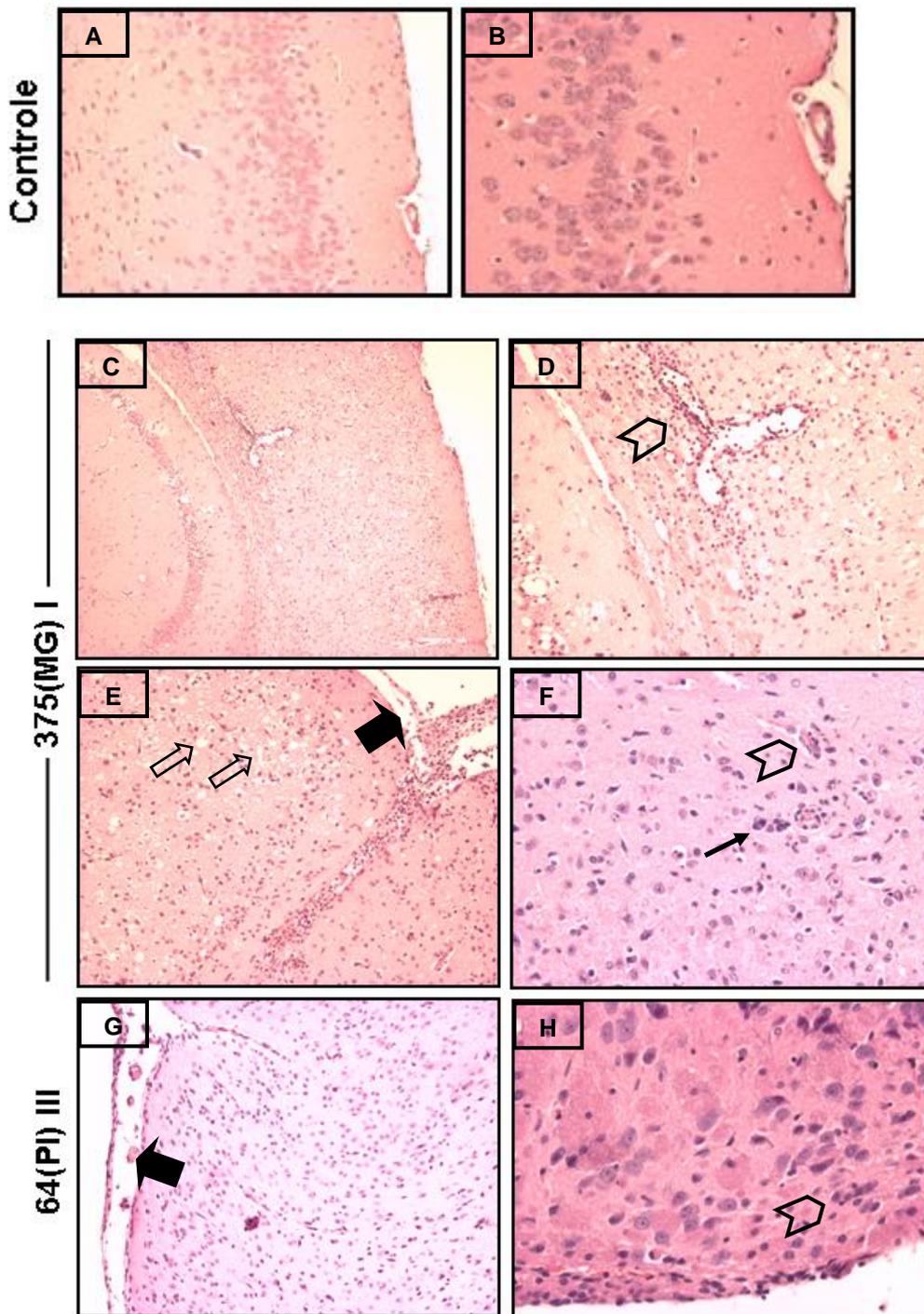


Figura 23: Histopatologia do cérebro de camundongos C57Bl/6 adultos inoculados com amostras do Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou 64(PI) genótipo III. Animais foram inoculados, via I.C., com 400 p.f.u., em volume de 20µL, e o espécime clínico foi coletado 8 dias p.i.. Painel com aumento de 100X (A, C, E e G), 200X (B, D, F e H). Os cérebros dos animais foram processados para inclusão em parafina e os cortes histológicos corados em H&E, representativos de 6 animais por grupo. As fotomicrografias A e B representam cortes

histológicos de camundongos controle sem alterações significativas. As fotomicrografias de C – F de camundongos infectados com DENV-3 375(MG) I, apresentam uma meningoencefalite intensa e difusa (C, E) com infiltrado inflamatório predominantemente de mononucleares (D,F) acompanhado de intensas alterações vacuolares e degenerativas do parênquima cerebral (setas abertas) e figuras sugestivas de morte por apoptose (seta em F). Cabeças de seta apontam para áreas de reatividade vascular e vasculite intensa (D,F). Há edema de meninges de grau acentuado (E, seta larga). As microfotografias de meninges e córtex cerebral de camundongos inoculados com DENV-3 64(PI) III apresentam alterações discretas (G e H). Meningite discreta, edema com descolamento focal das meninges (seta foto G), congestão em vasos meníngeos e discreta presença de células mononucleares (seta foto H).

5.5.3 – Resposta imune inflamatória no cérebro e soro de camundongos, após infecção intracraniana, com *Dengue virus* 3 de dois diferentes genótipos.

Entre o sétimo e oitavo dias após a infecção intracraniana, camundongos moribundos inoculados com DENV-3 375(MG) I ou inoculados com o DENV-3 64(PI) III sem sinais de doença foram sacrificados. O sangue periférico (soro) e cérebro foram retirados, processados e foi feito o ensaio “Cytometric Bead Assay” (CBA-BD™). A quantificação dos resultados foi feita pela fluorescência das esferas por citometria de fluxo para as citocinas, IL-6, IL-12, IL-10, TNF- α e IFN- γ , e a quimiocina, MCP-1, marcadores de uma resposta imune celular - inflamatória (figura 24).

Foi possível observar nas análises realizadas, nos cérebros dos animais infectados com o DENV-3 375(MG) I, um aumento significativo na produção nas citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-6 e da quimiocina MCP-1 em relação aos animais controle (figura 24A -24E). Contudo, não foi detectado IL-12 no cérebro destes animais pelo CBA. Quando comparados os resultados obtidos nos cérebros inoculados com as duas amostras do DENV-3, os níveis das citocinas TNF- α (figura 24A), IFN- γ (24B) e IL-6 (24E) apresentam um aumento estatisticamente significativo nos animais inoculados com a amostra DENV-3 375(MG) I (* $p < 0,05$).

Nos cérebros de camundongos inoculados com o DENV-3 64(PI) III não foram observadas alterações nos níveis de citocinas ou MCP-1. Essa amostra viral não foi capaz de montar uma resposta celular no cérebro como o isolado DENV -3 375(MG) I.

Com a finalidade de verificar a resposta imune celular sistêmica, foram avaliados os soros dos camundongos. Somente a citocina IFN- γ (figura 24B) e a quimiocina MCP-1(25C), mostraram-se aumentadas no soro em relação aos soros de animais controles. Ao passo que as citocinas IFN- γ (figura 25B) e IL-6(25D) e a quimiocina MCP-1 (25C) apresentaram diferenças estatisticamente

significativas com * $p < 0,05$ em um comparativo entre as duas amostras. Contudo, não foram detectados níveis de IL-12 e IL-10 no soro destes animais.

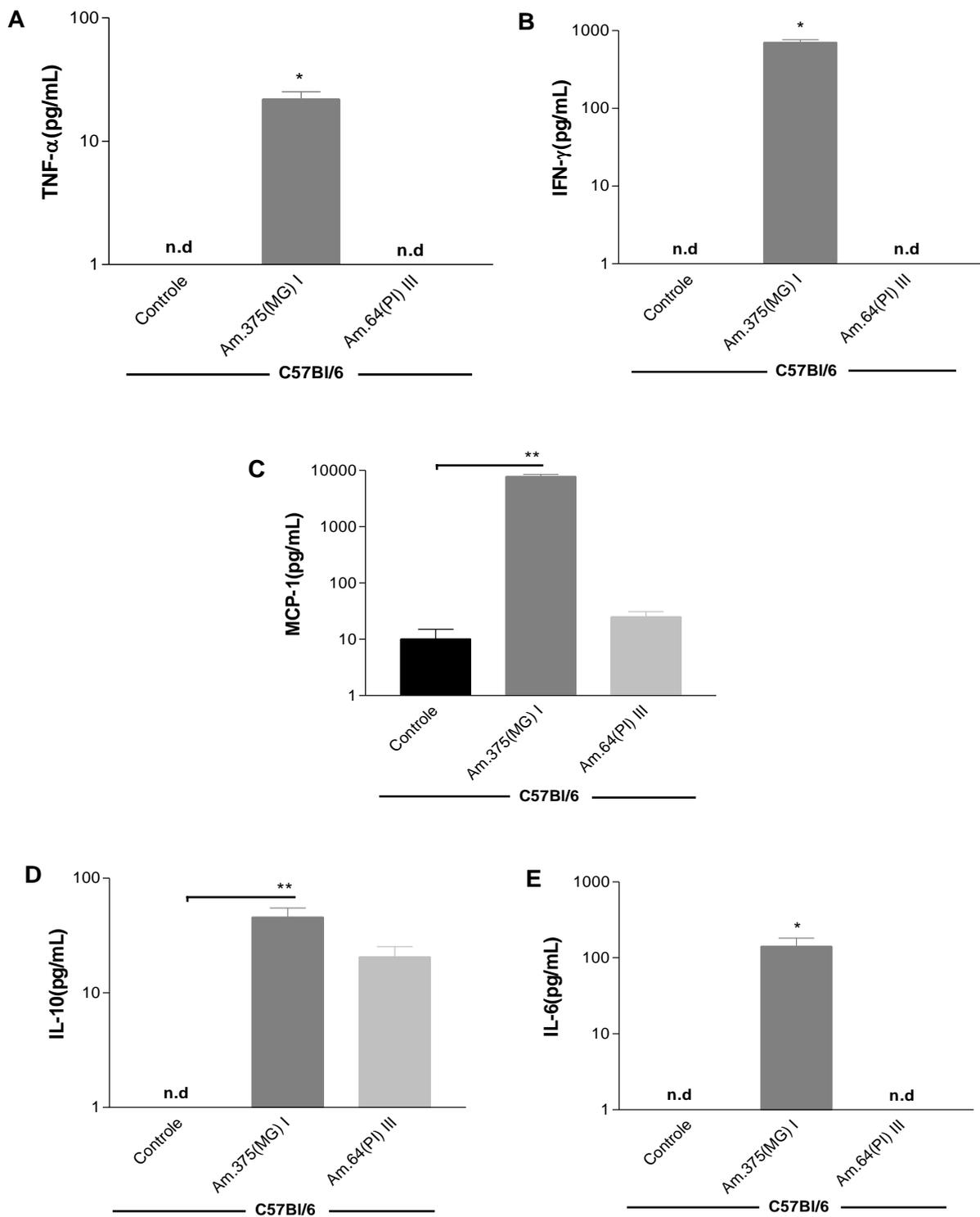


Figura 24: Resposta imune inflamatória em cérebros de camundongos infectados, via I.C., com o Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou com o *Dengue virus* 3 64(PI) genótipo III. Os animais C57BL/6 foram inoculados com cada amostra do DENV-3, com 4×10^2 p.f.u. em um volume final de 20 μ l, os animais controle foram inoculados com 20 μ l de L-15. Ambos os camundongos foram sacrificados, no 8^o dia p.i., com sinais avançados de encefalite nos animais com DENV 3 375(MG) I. Os cérebros foram retirados e processados. Foram dosadas

as citocinas TNF- α (**A**), IFN- γ (**B**), IL-10 (**D**), IL-6 (**E**) e a quimiocina MCP-1 (**C**), através do sistema CBA (Mouse Inflammation Kit – BDtm) e a aquisição por citometria de fluxo. O mínimo de seis animais infectados por grupo foi utilizado no experimento. As análises estatísticas foram feitas através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns e as barras representam o S.E.M, ou erro médio. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. N.d – não detectado. Am=amostra.

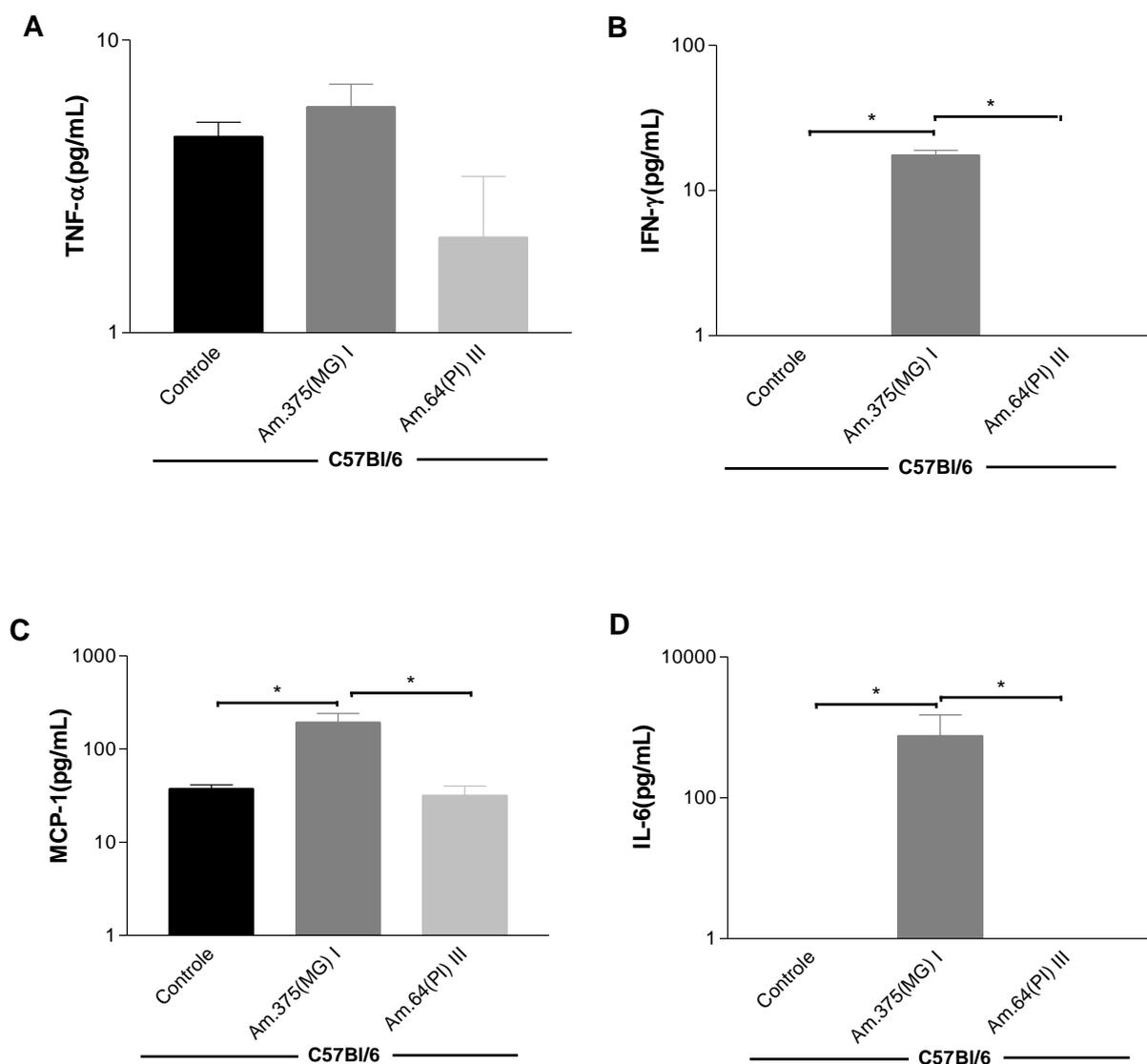


Figura 25: Resposta imune inflamatória no soro de camundongos infectados com o Dengue virus 3 375(MG) genótipo I ou com o Dengue virus 64(PI) genótipo III, via I.C.. Os animais C57BL/6 foram inoculados com cada amostra do DENV-3, com 4×10^2 p.f.u. em um volume final de 20µl, os animais controle foram inoculados com 20µl de L-15. Os camundongos foram sacrificados, no 8º dia p.i., com sinais avançados de encefalite nos animais com DENV 3 375(MG) I. Os soros foram obtidos e processados. Foram dosadas as citocinas TNF-α (A), IFN-γ (B), IL-6 (D) e a quimiocina MCP-1 (C), através do sistema CBA (Mouse Inflammation Kit – BD™) e a aquisição por citometria de fluxo. O mínimo de seis animais infectados por grupo foi utilizado no experimento. As análises estatísticas foram feitas através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns e as barras representam o S.E.M, ou erro médio. * $p < 0,05$. Am=amostra.

5.5.4 – Variações de dose de *Dengue virus 3 64(PI)* genótipo III inoculados em camundongos.

Com a finalidade de observar o aparecimento de possíveis sinais clínicos ou mortalidade de camundongos inoculados com doses crescentes de DENV-3 64(PI) III, animais foram inoculados, via I.C., com doses de 4×10^2 p.f.u., 4×10^3 p.f.u., 4×10^4 p.f.u. e 4×10^5 p.f.u. em volume de 20 μ L.

Não foram observados sinais ou mortalidade até o 8^o dia p.i. (dados não mostrados). Seis animais representativos de cada grupo foram anestesiados e coletado o sangue periférico. Assim como em experimentos anteriores, não houve diferença estatística significativa, $p < 0,05$, em nenhuma das doses de vírus inoculadas no leucograma (figura 26 e 27).

Foi feita também a titulação viral dos cérebros, de mínimo três animais para cada dose inoculada. Não foi detectada presença de partículas virais infecciosas nos cérebros dos camundongos inoculados com 4×10^2 p.f.u., 4×10^3 p.f.u. nem 4×10^4 p.f.u.. Somente nos animais inoculados com a dose de 4×10^5 p.f.u., foram detectadas partículas virais com um título de 75 partículas por mililitro (dados não mostrados).

Para verificar possíveis lesões no cérebro de camundongos inoculados com doses crescentes do vírus, estes animais foram sacrificados e os cérebros processados como de rotina, para inclusão em parafina e corados por hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram analisados, e correspondem no mínimo a três animais de cada dose. As microfotografias do painel de A – C (figura 28) são de animais controle (inoculados com meio L-15) e representam leptomeninges e córtex cerebral com aspecto histológico normal. Na figura 28, painel de D – O, são mostrados os cortes histológicos de cérebros de animais inoculados com DENV-3 64(PI) III, mostrando aumentos do córtex e meninges com focal e discreto infiltrado inflamatório de meninges, com hiperemia de vasos na dose de 4×10^2 p.f.u.. O painel G, H e I apresentam cérebro com uma infiltração de células mononucleares focal e

discreta no parênquima subcortical dos animais inoculados com 4×10^3 p.f.u.. Não há leptomeningite associada. No cérebro de animais com dose de 4×10^4 p.f.u. foram observados focos mais difusos de infiltrado parenquimatoso e moderada leptomeningite caracterizando a dose onde as alterações foram discretamente mais exuberantes que nas demais estudadas. Contudo, em infecção com a dose com 4×10^5 p.f.u., como visto em M, N e O, observa-se áreas com discreta inflamação das leptomeninges e uma área focal de infiltrado inflamatório por mononucleares.

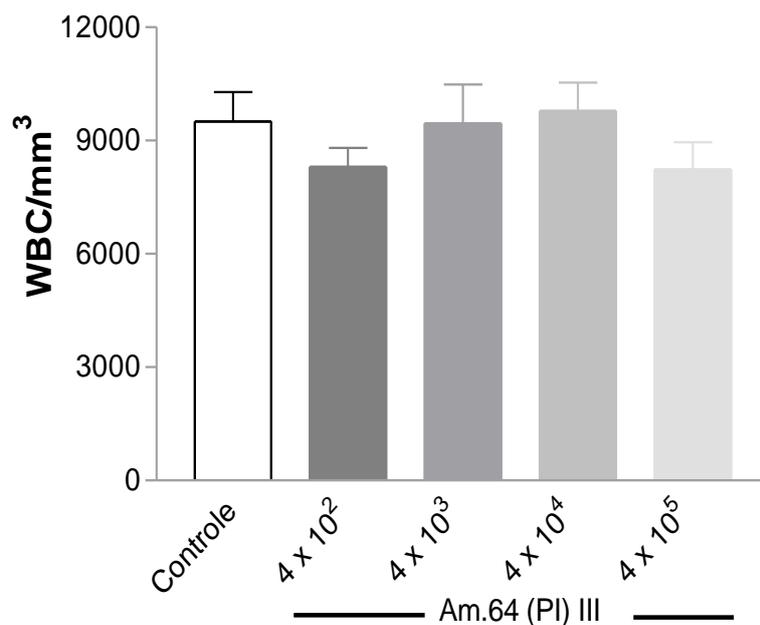


Figura 26: Contagem de leucócitos totais de camundongos C57Bl/6 inoculados com doses crescentes da amostra *Dengue virus 3 64(PI)* genótipo III. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 4×10^2 a 4×10^5 p.f.u., em um volume de $20\mu\text{L}$ do *Dengue virus 3 64(PI)* III, via i.c.. No 8º dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de leucócitos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma 3 e não houve diferença, estatisticamente, significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes doses inoculadas para a contagem global de leucócitos. Am=amostra.

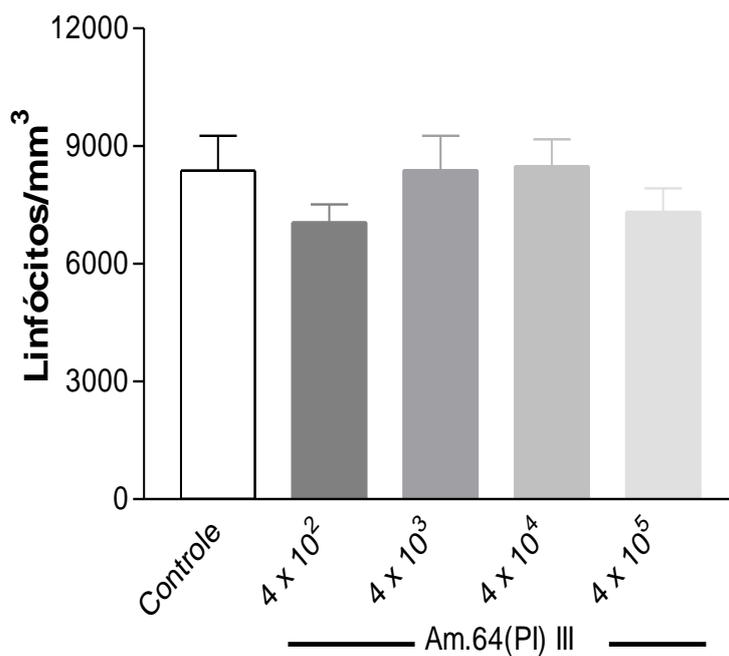


Figura 27: Contagem de linfócitos de camundongos C57Bl/6 inoculados doses crescentes da amostra *Dengue virus* 3 64(PI) genótipo III. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com 4×10^2 a 4×10^5 p.f.u., em um volume de $20\mu\text{L}$ do *Dengue virus* 3 64(PI) III, via i.c.. No 8º dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de linfócitos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma 3 e não houve diferença, estatisticamente, significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes doses inoculadas para a contagem de linfócitos. Am=amostra

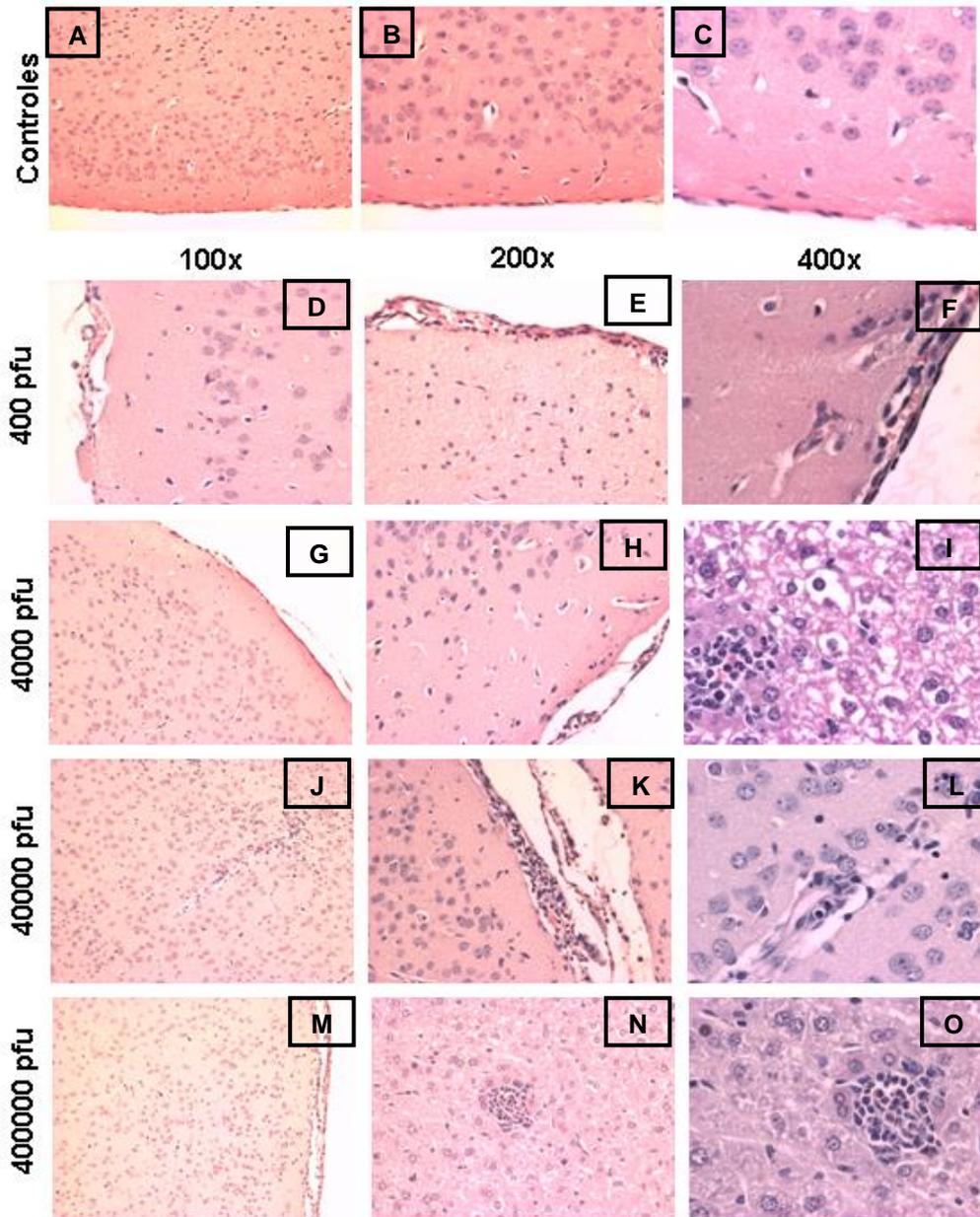


Figura 28: Histopatologia do cérebro de camundongos C57Bl/6 adultos controles e inoculados , por via I.C., com doses crescentes de Dengue virus 3 64(PI) genótipo III. Painel mostra aumentos de 100, 200 e 400x de cérebros controles e inoculados nas doses crescentes. Os cérebros dos animais foram processados rotineiramente para inclusão em parafina e os cortes histológicos corados em H&E. As fotomicrografias A, B e C representam leptomeninges e córtex cerebral controle, inoculados com 20 μ L de L-15, com aspecto histopatológico normal. Painel com aumento de 100X (A,D,G,J,N), 200X (B,E,H,L,O) e 400X (C,F,I,M,P). As fotomicrografias D, E, F mostram aumentos progressivos de córtex e meninges mostrando focal e discreto infiltrado inflamatório de meninges, com hiperemia de vasos na dose de 400 p.f.u.. As figuras G,H,I, mostram discreta e focal infiltração de células mononucleares no parênquima subcortical de animais injetados com 4.000 p.f.u. Não há leptomeningite

associada. As figuras J,K,L na dose de 40.000 p.f.u., observaram-se focos mais difusos de infiltrado parenquimatoso e moderada leptomeningite, caracterizando a dose onde as alterações foram discretamente mais exuberantes que nas demais estudadas, inclusive a dose de 400.000 p.f.u. que é amostrada em, M,N e O, onde se observa área de discreta inflamação das leptomeninges e uma área bem delimitada de infiltração inflamatória por mononucleares.

5.6 – Estudo da virulência da amostra Dengue virus 3 375 (MG) genótipo I (Figueiredo et al., 2008) em camundongos deficientes para genes relacionados à resposta imune inata.

5.6.1 – Susceptibilidade dos camundongos à inoculação do Dengue virus – 3 375(MG) I.

Para avaliar a importância de genes relacionados com a resposta imune inata, foram utilizadas linhagens isogênicas de camundongos deficientes em IFN- γ , TNFr p55 e iNOS infectados com 4×10^2 p.f.u. da amostra *Dengue virus* 3 375(MG) I, por via I.C..

Nos camundongos IFN- γ -/-, a partir do 6º dia p.i., os animais apresentaram o início dos sinais clínicos como paralisia, espasmos, piloereção, arqueamento de dorso e cegueira. Entre o 7º e o 8º dia p.i. todos os camundongos IFN- γ - / - haviam morrido (figura 29). Os órgãos destes animais sacrificados foram retirados e titulados, e no cérebro foi obtido um título de $3,5 \times 10^5$ p.f.u./mL. Não foi detectado vírus nos outros órgãos (tabela 10).

Nos camundongos C57Bl/6, selvagens, inoculados com DENV-3 375(MG) I os sinais clínicos se iniciam entre o 6º e o 7º dia p.i.. Assim, sete dos nove animais apresentaram sinais irreversíveis de encefalite, no 7º dia p.i., foram sacrificados e extraídos cérebro, pulmões, fígado, baço e os órgãos foram processados para titulação. O vírus foi detectado, no cérebro, com título de 2×10^6 p.f.u./mL. Entre 7º e o 8º dia p.i., camundongos apresentaram 100% de mortalidade (figura 29). Os camundongos C57Bl/6, com inoculação de mesma concentração do vírus tiveram o aparecimento de sinais clínicos para encefalite retardada em 24 horas em relação aos camundongos deficientes para IFN- γ .

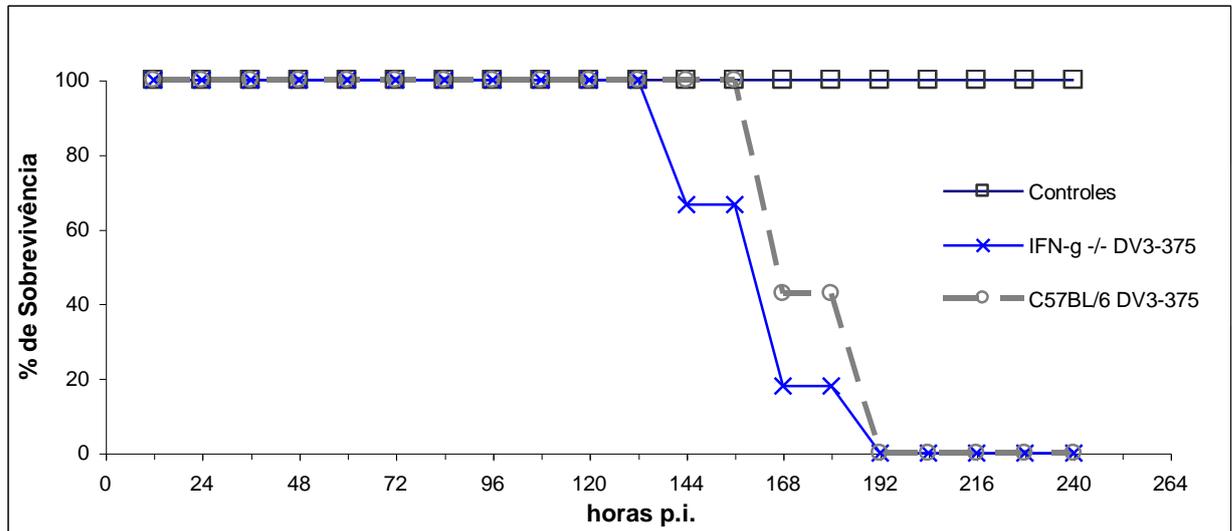


Figura 29: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6 e IFN- γ -/-, com 05 -09 semanas, infectados com Dengue vírus 3 375 (MG) genótipo I. Camundongos C57Bl/6 (n=3), IFN- γ -/-(n=4) foram inoculados com 20 μ L de meio L-15 (controles, quadrado), ou com 4 x 10² p.f.u., via I.C., do Dengue vírus 3 375(MG) I (C57Bl/6, círculo verde, n=9; IFN- γ -/-, círculo vermelho, n=11;).

Tabela 10. Determinação dos títulos (p.f.u./mL) do vírus nos órgãos de camundongos C57B/6 e IFN- γ -/-, infectados, via I.C., com 4×10^2 p.f.u., em $20\mu\text{L}$, do *Dengue virus 3 – 375(MG) I*.

Camundongos deficientes inoculados com 4×10^2 pfu/camundongo	CÉREBRO ^a (p.f.u./mL)	FÍGADO	BAÇO	PULMÃO
IFN-γ -/-	$3,5 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^6$	ND ^b	ND ^b	ND ^b
C57BI/6	$2,5 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$	ND ^b	ND ^b	ND ^b

^a média \pm desvio padrão dos títulos de 3 camundongos de cada linhagem.

ND^b- não detectado

* Não houve formação de placas virais nos órgãos de camundongos controles das diferentes linhagens.

5.6.2 – Contagem de leucócitos no sangue periférico.

Para avaliar as alterações hematológicas, no 7º dia p.i., foram coletados sangue periférico dos camundongos IFN- γ -/- e C57Bl/6 selvagem, através da veia plexo-braquial, depois de anestesiados. Foi feito leucograma completo e observado uma redução significativa na contagem global de leucócitos e de linfócitos comparados aos controles, nos animais C57Bl/6. Nos camundongos IFN- γ -/- (WBC= 2233) inoculados com DENV-3 375(MG) I a análise resultou em uma redução com um $p > 0,05$ comparada aos IFN- γ -/- controles (WBC= 4200), mostrando não haver leucopenia nesta linhagem (figura 30). Contudo, nos camundongos C57Bl/6 (WBC= 2500) inoculados com o vírus em relação aos controles (WBC= 7566), esta redução no global de células brancas, foi evidente, comparado com análise nos camundongos IFN- γ -/-, obtendo um $***p < 0,001$ (figura 30).

Vale destacar, a observação de uma diminuição absoluta para a contagem global de leucócitos nos camundongos IFN- γ -/- controles (WBC= 4200) em relação aos camundongos C57Bl/6 controle (WBC= 7566) com um $**p < 0,01$, ou seja, uma redução percentual de 45% no número de leucócitos nos animais deficientes para IFN- γ (figura 30).

A contagem absoluta de linfócitos nos camundongos IFN- γ -/- inoculados com DENV-3 375(MG) I (Linfócitos=1903) apresentaram um valor de $**p < 0,01$, estatisticamente significativo, comparado aos IFN- γ -/- controles (Linfócitos=3277) como mostrado na figura 31. Já nos camundongos C57Bl/6 infectados (Linfócitos=2233) comparado aos controles (Linfócitos=7566) a quantidade de linfócitos absolutos foi reduzida, significativamente, com um de $***p < 0,001$ e em percentual de 42% (figura 31).

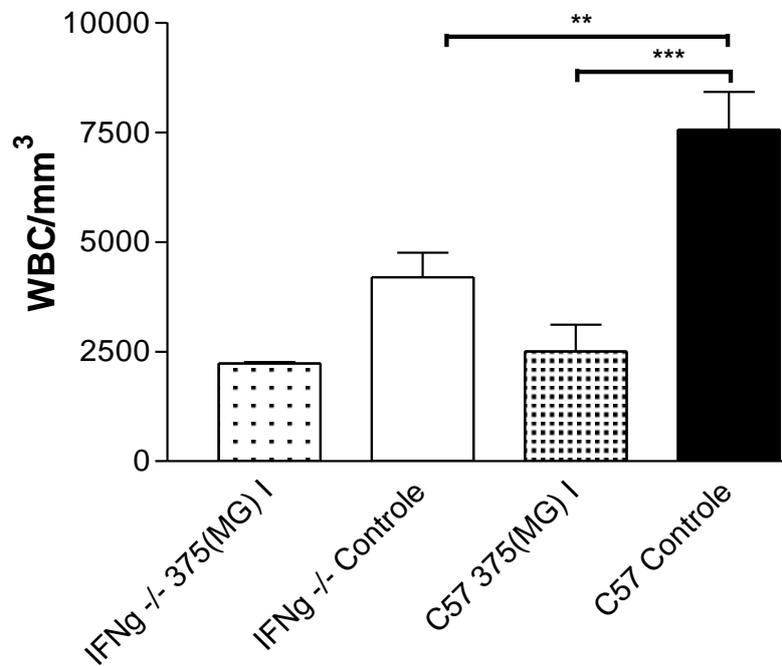


Figura 30: Contagem de leucócitos em camundongos C57Bl/6 e IFN- γ inoculados com *Dengue virus* 3 **375(MG) genótipo I**. Camundongos C57Bl/6 e IFN γ -/- foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de 20 μ L do *Dengue virus* 3 375(MG) I, via I.C.. No 7^o dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de leucócitos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma 3, ANOVA com teste Newman-Keuls, obtendo um valor de $p > 0,05$ (ns), nos camundongos IFN γ -/- com *Dengue virus* 3 375(MG) I vs. controles e um $***p < 0,001$, em camundongos C57Bl/6 com *Dengue virus* 3 375(MG) I vs. controles. Há diferença, significativa ($**p < 0,01$), entre camundongos IFN γ -/- controles vs C57Bl/6 controles..

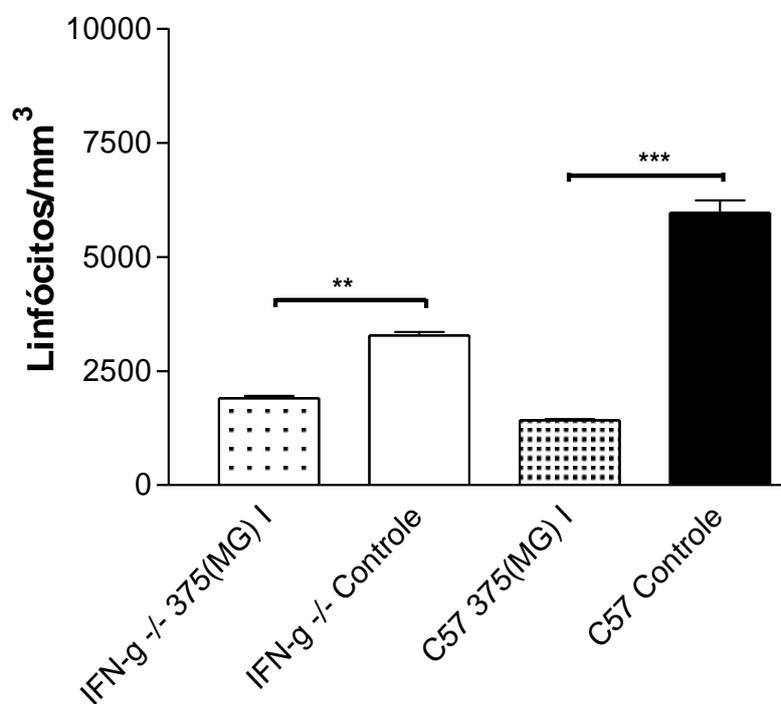


Figura 31: Contagem de linfócitos em camundongos C57Bl/6 e IFN γ -/- inoculados com *Dengue virus 3 375(MG)* genótipo I. Camundongos C57Bl/6 e IFN γ -/- foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de 20 μ L, do *Dengue virus 3 375(MG)* I, via I.C.. No 7^o dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de linfócitos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma 3, ANOVA com teste Newman-Keuls, obtendo um valor de ** $p < 0,01$, nos camundongos IFN γ -/- com *Dengue virus 3 375(MG)* I vs. IFN γ -/- controles e um *** $p < 0,001$, em camundongos C57Bl/6 com *Dengue virus 3 375(MG)* I vs C57Bl/6 controles.

5.6.3 – Histopatologia do cérebro e pulmões de camundongos C57Bl/6 e IFN- γ -/-.

Devido à mortalidade dos camundongos, associada à amostra *Dengue virus* 3 375(MG) I, e os resultados obtidos pela análise de células mononucleares, foram avaliados os cortes histológicos de cérebro e pulmão, de camundongos C57Bl/6 e deficientes para IFN- γ foram para detectar possíveis alterações. Os camundongos foram infectados com 4×10^2 p.f.u., em volume de 20 μ L do DENV-3 375(MG) I.

Nos cortes de cérebro dos animais IFN γ -/- inoculados com o vírus foi observada uma meningite, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares na leptomeninge, além de manguitos perivasculares linfocitários, caracterizados pela presença de células inflamatórias mononucleares ao redor de vasos sanguíneos (figura 32B e 32E).

Nos cortes do córtex cerebral de camundongos C57Bl/6 infectados, foram observados manguitos perivasculares linfocitários, caracterizados pela presença de células inflamatórias mononucleares ao redor de vasos sanguíneos (figura 32C e 32F), quando comparados com o cérebro de camundongos C57Bl/6 controles (figura 32A e 32D) que apresentaram córtex cerebral com aspecto histopatológico normal.

Nos pulmões dos animais infectados com DENV-3 375(MG) I, foi observado um espessamento dos septos interalveolares, devido a um infiltrado de células inflamatórias mononucleares, caracterizando um processo de pneumonia intersticial, característico de infecções virais (figuras 33B e 33C). Nos cortes de pulmões de camundongos IFN γ -/- infectados foi observado espessamento dos septos interalveolares com infiltrado de células mononucleares, congestão vascular e pneumonia intersticial (figuras 33E e 33F). Não foi observada nenhuma alteração no parênquima pulmonar dos animais controle (figura 33A e 33D).

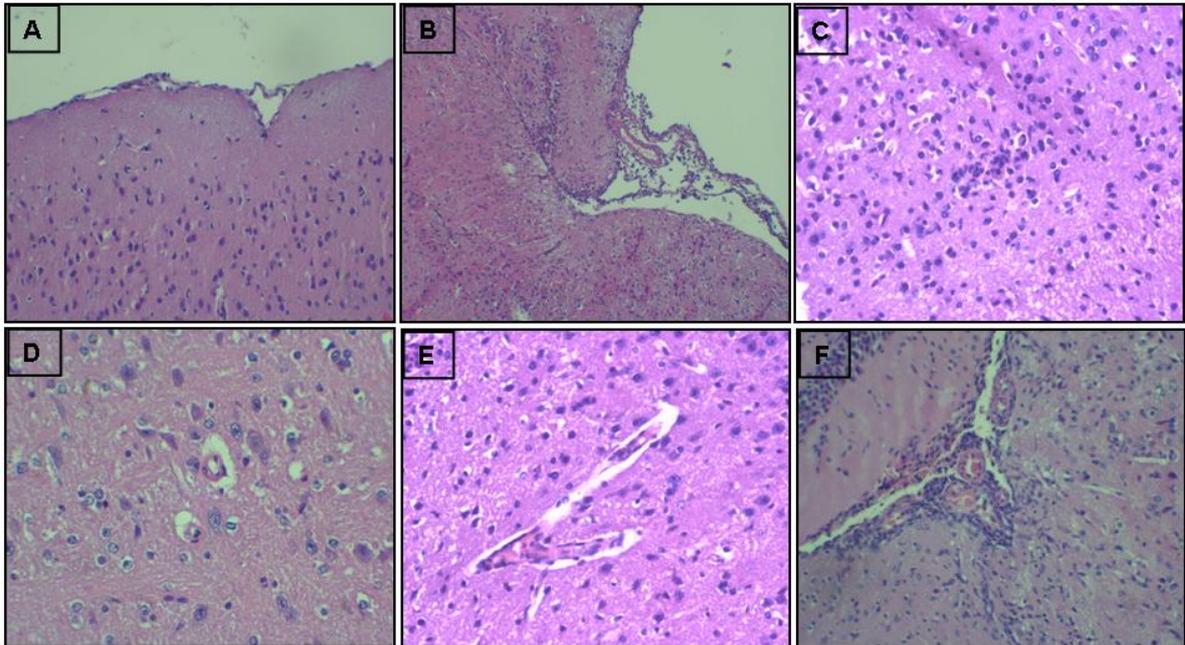


Figura 32: Histopatologia do cérebro de camundongos C57Bl/6 e IFN- γ -/- infectados, por via i.c., com 4×10^2 p.f.u., em volume de 20 μ L, com *Dengue virus 3 375(MG)* genótipo I. Painel horizontal superior com aumento de 100X (A, B e C) e inferior com aumento de 400X (D, E e F). Camundongos foram sacrificados, no 7^o dia p.i., e os cérebros dos animais foram processados rotineiramente para inclusão em parafina e os cortes histológicos corados em H&E. As fotomicrografias A e D secção histológica do cérebro de camundongos controle com leptomeninge e vasos normais. As fotomicrografias, B e E, apresentam alterações celulares e teciduais no córtex cerebral com meningite e um infiltrado predominantemente de mononucleares nos camundongos IFN- γ -/- com DENV-3 375(MG) I. As fotomicrografias, C e F, mostram alterações cerebrais, com infiltrado inflamatório de mononucleares, caracterizado por manguito perivascular linfohistiocitário em camundongos C57Bl/6 com o mesmo vírus.

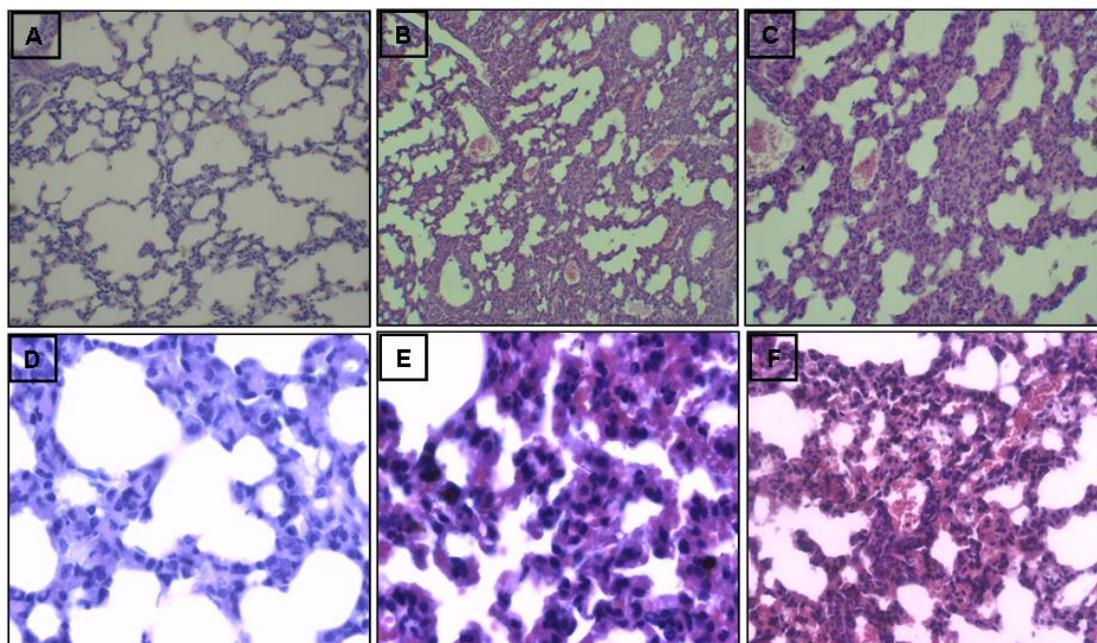


Figura 33: Histopatologia dos pulmões de camundongos C57Bl/6 e IFN- γ -/- infectados, por via i.c., com 4×10^2 p.f.u., em volume de 20 μ L, com *Dengue virus 3 375(MG)* genótipo I. Painel com aumento de 400X (A-F). Camundongos foram sacrificados, no 7 $^{\circ}$ dia p.i., o pulmão dos animais foram processados rotineiramente para inclusão em parafina e os cortes histológicos corados em H&E. As fotomicrografias, A e D, exibe uma secção histológica do pulmão de camundongos controle com parênquima pulmonar normal. As fotomicrografias, B e C, apresentam uma secção histológica do pulmão de camundongos C57B/6 infectados apresentando modificações celulares com espessamento dos septos interalveolares, infiltrado inflamatório de mononucleares, caracterizando pneumonia intersticial. As fotomicrografias, E e F, mostram alterações no parênquima pulmonar com infiltrado inflamatório de mononucleares, vasos congestionados, espessamento dos septos, caracterizando pneumonia em camundongos IFN- γ -/- com DENV-3 375(MG) I.

No intuito de investigar a relevância de citocinas relacionadas à resposta inata, camundongos TNFr p55 ^{-/-} foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em volume de 20 μ L do *Dengue virus* 3 375(MG) I, via I.C.. Os sinais clínicos foram observados com retardo de 24 horas quando comparados aos camundongos C57Bl/6 (figura 34). No 7^o dia p.i., os camundongos C57Bl/6 apresentavam sinais clínicos associados à encefalite (paralisia dos membros, arqueamento do dorso, piloereção etc.), enquanto que os camundongos TNFr p55 ^{-/-} não apresentavam sinais evidentes de encefalite. No 8^o dia p.i., os camundongos TNFr p55 ^{-/-} apresentavam tremores, espasmos e arqueamento, porém não possuíam paralisia de membros posteriores e apesar de haver mortalidade total destes animais, os sinais foram mais brandos comparados aos controles.

Os camundongos C57Bl/6 foram sacrificados, no 7^o dia p.i., e os órgãos foram retirados e processados para titulação dos vírus no cérebro, obtendo-se título de 3×10^6 p.f.u./mL. Não foi detectado vírus nos demais órgãos avaliados (tabela 11). Camundongos TNFr p55 ^{-/-} foram sacrificados, 8 dias p.i. e os órgãos retirados e titulados para quantificar os vírus. Foi detectado vírus no cérebro dos camundongos deficientes com título $1,5 \times 10^6$ p.f.u./mL e não houve detecção de vírus no baço, fígado e/ou nos pulmões (tabela 11). Com o intuito de verificar vírus circulante foram feitas titulações, no soro dos camundongos inoculados com vírus, não sendo detectado partículas virais em nenhum dos três soros testados. Houve susceptibilidade total de ambas as linhagens, com retardo de 24 horas dos camundongos TNFr p55 ^{-/-} com DENV-3 375(MG) I em relação aos C57Bl/6 com o mesmo vírus (figura 34).

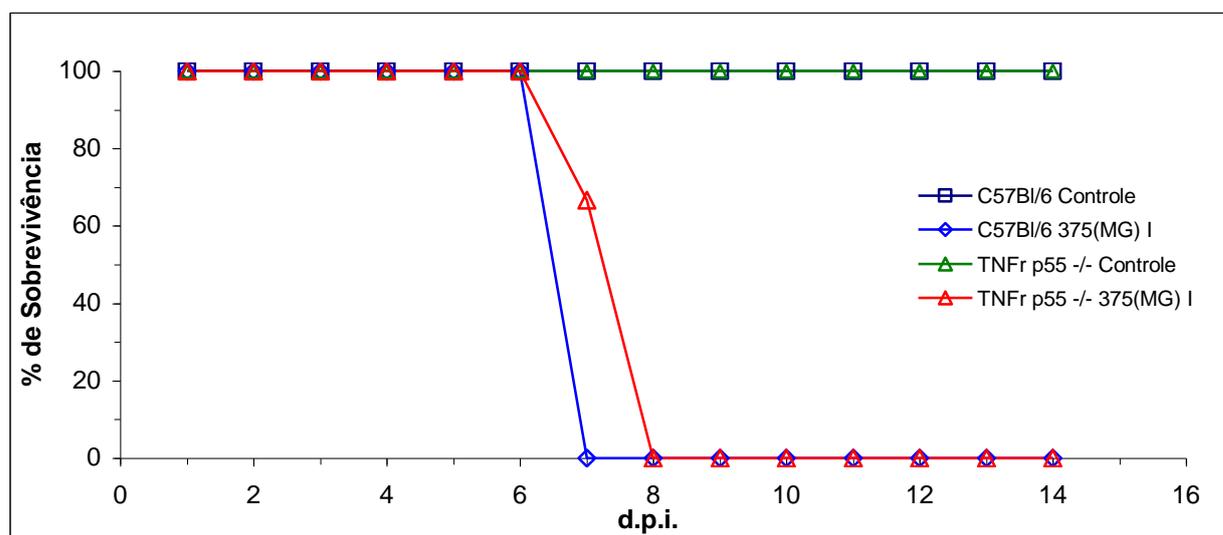


Figura 34: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 -/-, com 9 semanas, infectados com *Dengue virus 3 375(MG) I*. Camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 -/- foram inoculados com 20 μ L de meio L-15 (controles, C57Bl/6, quadrado, n=3 e TNFr p55 -/-, triângulo verde, n=2) ou com 4 x 10² p.f.u., via I.C., do *Dengue virus 3 375(MG) I* (C57Bl/6, losango, n=3; TNFr p55 -/-, triângulo vermelho, n=3).

Tabela 11. Determinação dos títulos (p.f.u./mL) do vírus dos órgãos e soros de camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 -/- infectados, via I.C., com 4×10^2 p.f.u., em 20 μ L, do *Dengue virus 3 – 375(MG) I*.

	CÉREBRO ^a (p.f.u./mL)	FÍGADO	BAÇO	PULMÃO	VIREMIA
C57Bl/6	$3,0 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
TNFr p55 -/-	$1,5 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b

^a média \pm desvio padrão dos títulos de 3 camundongos de cada linhagem.
 ND^b - não detectado.

Com a finalidade de observar no sangue total de camundongos C57B/6 e TNFr p55 -/- alterações em células envolvidas na patogênese do dengue foi feita a contagem total dos leucócitos nos camundongos C57Bl/6 infectados (WBC= 1200) que apresentaram uma diminuição, estatisticamente significativa, quando comparados aos controles (WBC= 13250), com um valor de $***p < 0,001$ (figura 34). Nos animais TNFr p55-/- inoculados com *Dengue virus* 3 375(MG) I comparados aos TNFr p55-/- controles ocorreu uma leucopenia como visto pelo valor de $**p < 0,01$ (figura 35). Contudo, entre os animais C57Bl/6 e TNFr p55 -/- inoculados com o vírus não houve diferença significativa no total de leucócitos.

Para os valores numéricos dos linfócitos avaliados, houve uma linfopenia absoluta, estatisticamente significativa para ambas as linhagens de camundongos. Os animais C57Bl/6 inoculados (Linfócitos= 927) com o vírus apresentaram um valor de $***p < 0,001$, enquanto que para os camundongos deficientes no receptor 55Kd de TNF (Linfócitos= 2100) houve um valor de $**p < 0,01$, quando comparado aos respectivos controles (figura 36).

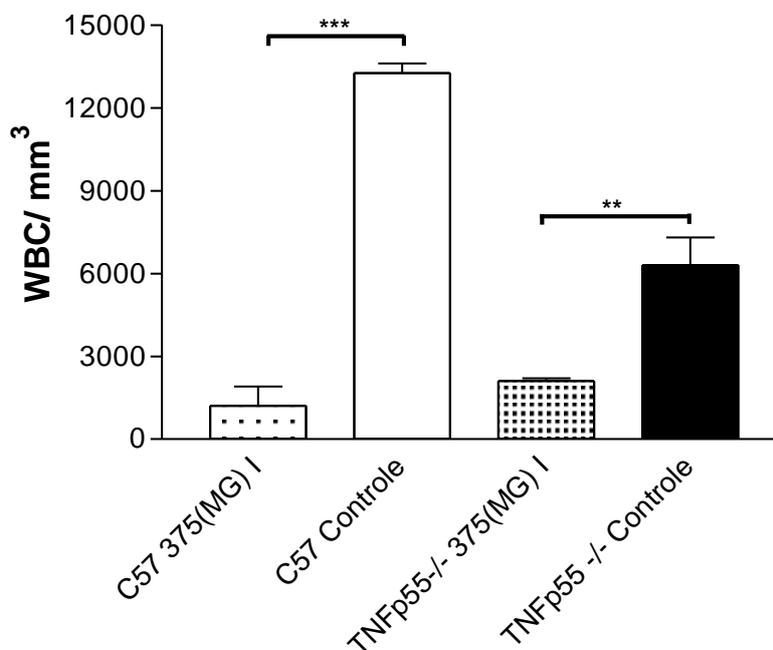


Figura 35: Contagem de leucócitos de camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 -/- inoculados com *Dengue virus 3 375(MG) I* comparados aos controles. Camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 -/- foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de $20\mu\text{L}$, do *Dengue virus 3 375(MG) I*, via I.C.. No 7^o dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de leucócitos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma3, ANOVA com teste Newman-Keuls, obtendo um valor de *** $p < 0,001$, nos camundongos C57Bl/6 com *Dengue virus 3 375(MG) I* vs. controles. No 8^o dia p.i., camundongos TNFr p55 -/- com *Dengue virus 3 375(MG) I* vs. TNFr p55 -/- controle com um valor de ** $p < 0,01$. Não houve diferença significativa entre as diferentes linhagens e inoculados com o *Dengue virus 3*.

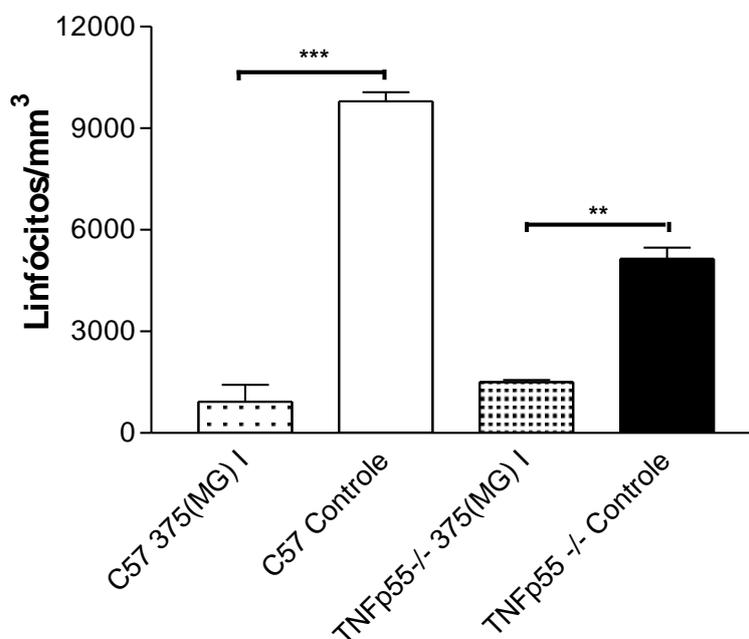


Figura 36: Contagem de linfócitos de camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 -/- inoculados com *Dengue virus 3 375(MG) I* comparados aos controles. Camundongos C57Bl/6 e TNFr p55 -/- foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em um volume de $20\mu\text{L}$, do *Dengue virus 3 375(MG) I*, via I.C.. No 7º dia p.i., o sangue total foi coletado e utilizado para a contagem absoluta de linfócitos. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Prisma 3, ANOVA com teste Newman-Keuls, obtendo um valor de $***p < 0,001$, nos camundongos C57Bl/6 com *Dengue virus 3 375(MG) I* vs. controles. Camundongos TNFr p55 -/- com *Dengue virus 3 375(MG) I* vs. TNFr p55 -/- controle, no 8º dia p.i., apresentaram um $** p < 0,01$.

Em um experimento, com objetivo de avaliar camundongos deficientes na enzima sintetase óxido nítrico indutível (iNOS) e TNFr p55 em paralelo, camundongos foram inoculados com 4×10^2 p.f.u., em volume de 20 μ L do DENV-3 375(MG) I, via I.C..Os camundongos iNOS -/-, semelhante aos camundongos TNFr p55 -/-, apresentaram os primeiros sinais clínicos com retardo de 24 horas quando comparados aos animais C57Bl/6 com mesma dose do vírus (figura 37).

No 6º dia p.i., dois animais C57Bl/6 apresentaram os sinais clínicos com tremores e espasmos. No dia seguinte, camundongos iNOS -/- e TNFr p55 -/- apresentavam letargia e sinais iniciais para encefalite, a evolução dos sinais nestes animais foi mais lenta em relação aos C57Bl/6. Contudo quatro camundongos C57Bl/6 com vírus já apresentavam falta de movimentação (paralisia de membros) e moribundos. Entre o 7º e 8º dia p.i., dois camundongos C57Bl/6 morreram e cinco camundongos infectados estavam com sinais irreversíveis da doença, dos quais três foram sacrificados para retirada de órgãos (figura 37).

Camundongos iNOS -/- e TNFr p55 -/- inoculados com DENV-3 375(MG) I, no 8º dia p.i., não se movimentavam, com arqueamento e paralisia de membros, sinais similares aos animais selvagens no 7º dia p.i., ou seja, um retardo de 24 horas no decorrer da infecção. Três camundongos iNOS inoculados foram sacrificados e os órgãos foram extraídos. Entre o 9º e 10º dia p.i., houve mortalidade total dos animais deficientes para iNOS (figura 36). Um animal TNFr p55 -/- infectado, apresentava paralisia dos membros posteriores, mas com movimentação. Contudo, no 10º dia p.i., este animal encontrava-se moribundo, sendo sacrificado e processado (figura 37).

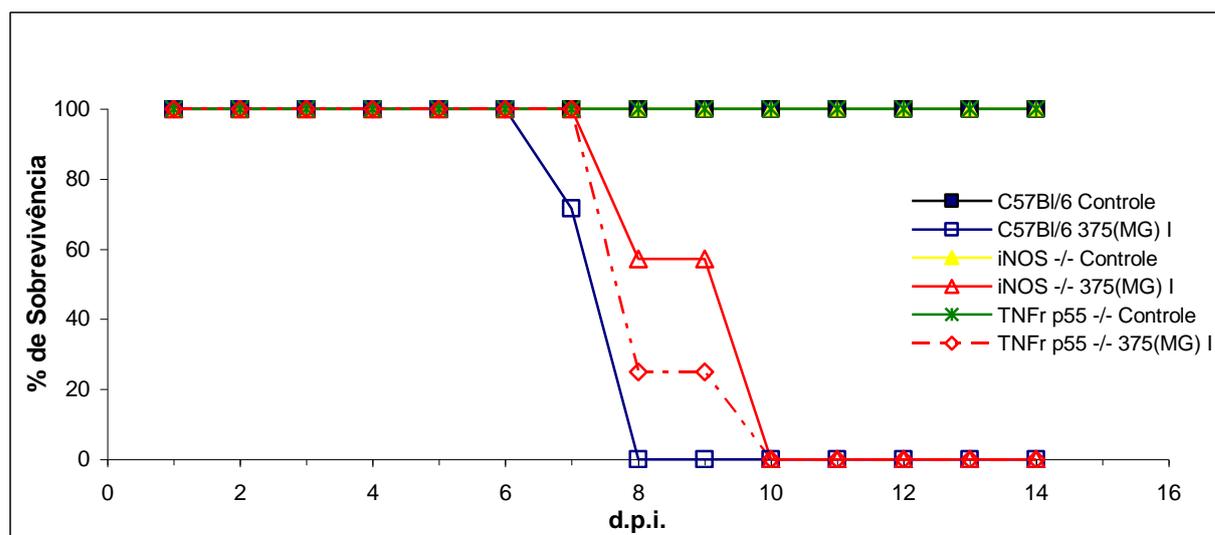


Figura 37: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6, iNOS -/- e TNFr p55 -/-, com 07 semanas, infectados com *Dengue virus 3 375 (MG)* genótipo I. Camundongos C57Bl/6, iNOS -/- e TNFr p55 -/- foram inoculados com 20 μ L de meio L-15 (controles - C57Bl/6, (n=3); iNOS -/-, (n=2) e TNFr p55 -/-, (n=2)) ou com 4×10^2 p.f.u., via I.C., do *Dengue virus 3 375 (MG) I* (C57Bl/6, quadrado azul, n=7; iNOS -/-, triângulo vermelho, n=7 e TNFr p55 -/-, losango, n=4).

5.6.4 – Resposta de camundongos C57Bl/6 e deficientes para IFN- γ e TNFr p55 inoculados, via I.C., com 40 p.f.u. do *Dengue virus 3 375(MG)* genótipo I.

Em experimentos anteriores foram inoculadas doses de 4×10^2 p.f.u. do DENV-3 375(MG) genótipo I em camundongos C57Bl/6 e naqueles deficientes em diferentes citocinas relacionadas à resposta imune inata. A partir disto, foram observados sinais de encefalite e mortalidade, diminuição de células sanguíneas (leucopenia, neutropenia), título viral detectáveis no cérebro e, ainda, o aumento da produção de algumas citocinas e quimiocinas no cérebro e soro destes vários animais.

A partir destes resultados foram feitos experimentos com dose de 40 p.f.u. em volume de 20 μ L, do DENV-3 375(MG) I para verificar se haveria um retardo no aparecimento de sinais clínicos e na sobrevida. Assim, nos animais selvagens e deficientes para IFN- γ e para receptor p55 de TNF, foi observado que a taxa de sobrevivência (figura 38), apesar de ser a mesma, exibe uma mortalidade retardada em todas as linhagens analisadas, permanecendo, ainda, os mesmos sinais de encefalite. Os animais deficientes em IFN- γ têm mortalidade total até o oitavo dia p.i., enquanto os animais C57B/6 apresentam sobrevida até o décimo dia p.i. e os, TNFr p55 -/-, morrem entre o décimo e o décimo segundo dias p.i., conforme figura 38.

Partes dos cérebros destes animais foram retirados e processados para as análises histopatológicas, incluídos em parafina e corados por hematoxilina e eosina, conforme protocolo de rotina da técnica, e a outra porção armazenadas a -70°C para dosagens de citocinas por CBA. O soro destes camundongos foi obtido após anestesia.

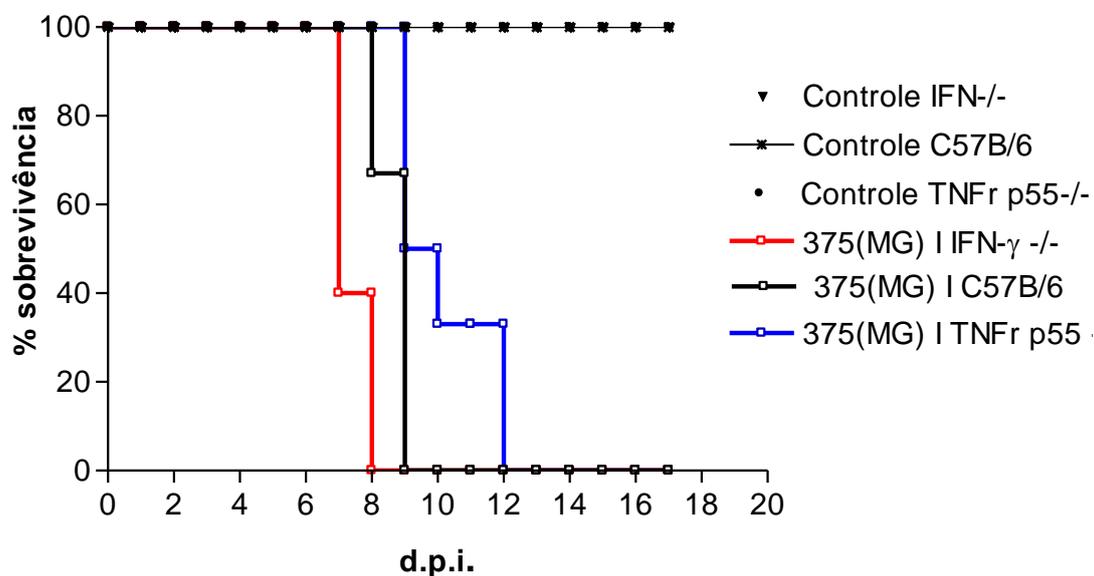


Figura 38: Curva de sobrevivência de camundongos C57Bl/6, IFN- γ -/-, TNFr p55 -/-, com 06 -08 semanas, infectados com o *Dengue virus* 3 375(MG) genótipo I. Camundongos C57Bl/6 controles foram inoculados com 20 μ L do meio L-15 (n= 4 por linhagem C57Bl/6, IFN- γ -/- e TNFr p55 -/-) ou inoculados com 40 p.f.u, via I.C., do DENV-3 375(MG) I (n=6 por linhagem C57Bl/6, IFN- γ -/-, TNFr p55 -/-) em animais deficientes para os genes citados.

Os cortes histológicos dos cérebros de animais das linhagens estudadas foram analisados, e são representativos de seis cérebros para cada grupo inoculado. As fotomicrografias apresentadas na figura 39, painel de A-C mostram um aspecto histológico habitual de cérebros controle das linhagens C57Bl/6, IFN- γ -/- e TNFr p55 -/-.

As fotografias, do painel D a H, são representativas de cortes do córtex cerebral e meninges dos grupos inoculados com o DENV 3 375(MG) I na dose de 40 p.f.u.. Na figura D, em C57Bl/6, observa-se áreas de encefalite em focos difusos, predominantemente, perivascular. Há hiperemia dos vasos do cérebro com nítido acúmulo de células próximo aos vasos. Na fotografia E, em animais IFN- γ -/-, ocorre uma meningite focal e moderada, caracterizada por infiltração de células, predominantemente, mononucleares nas meninges, acompanhado de focos de encefalite focal perivascular como demonstrado no detalhe (foto em G). Nos animais TNFr p55-/-, com DENV -3 375(MG) I, há uma discreta meningite, com hiperemia e edema, e pequeno acúmulo de células inflamatórias (figura 39, foto em F). No detalhe, foto H observa-se foco de lesão no parênquima subjacente, exibindo grau moderado de vacuolização citoplasmática, com presença de células com núcleo picnótico, compatíveis com morte/apoptose celular e alterações celulares como picnose (figura 39). Contudo, nos animais, IFN- γ -/-, é de acometimento é mais focal e de menor grau de intensidade nas alterações neuro-degenerativas.

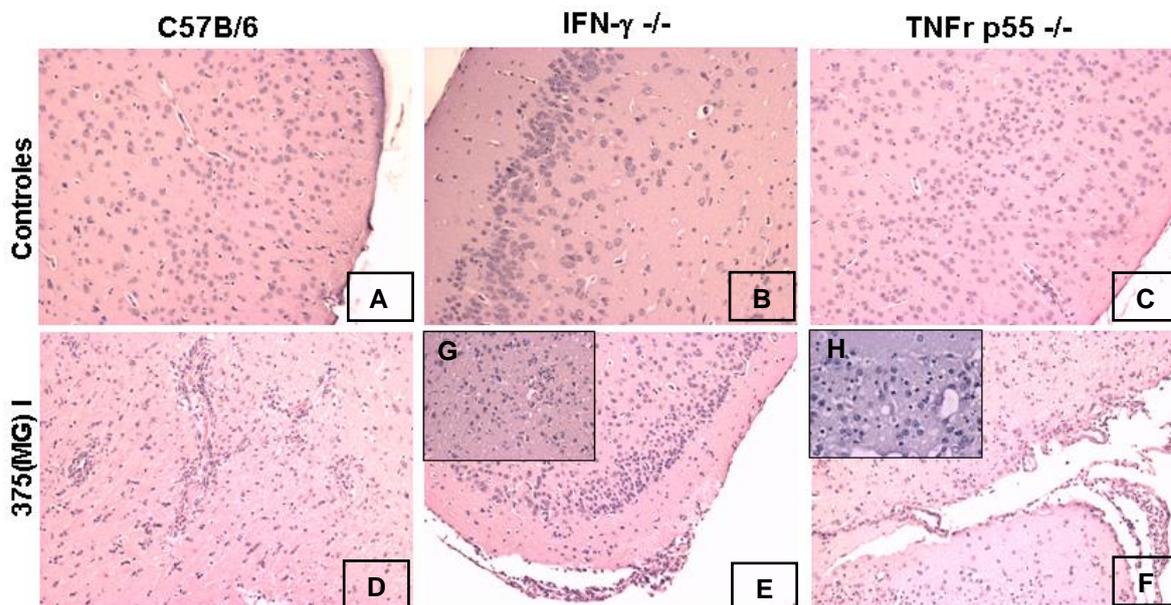


Figura 39: Histopatologia do cérebro de camundongos C57BI/6 adultos controles e inoculados, via I.C., com 40 p.f.u., em volume de 20 μ L, com *Dengue virus 3 375(MG) genótipo I*. Painel com aumento de 100X (A –F), 200X (G) e 400X (H). Os cérebros dos animais foram processados rotineiramente para inclusão em parafina e os cortes histológicos corados em H&E. As fotomicrografias A, B e C representam cérebros controles das linhagens C57BI/6, IFN- γ -/- e TNFr p55 -/- apresentaram aspecto histológico habitual. As figuras D-H mostram aspecto panorâmico do córtex e meninges de 6 animais representativos das linhagens C57BI6, IFN- γ -/- e TNFr p55 -/- , respectivamente. Na figura D, C57 375(MG) I, observa-se áreas de encefalite em focos difusos, predominantemente, perivascular. Há hiperemia dos vasos cerebrais e nítido acúmulo de células perivasculares. Na fig. E, IFN- γ -/- 375(MG) I, há evidência de meningite focal de grau moderado, caracterizada por infiltração de células, predominantemente, mononucleares nas meninges, acompanhado de focos de encefalite focal perivascular como demonstrado no detalhe (fig. G). Na figura F, TNFr p55-/- 375(MG) I, há meningite de grau discreto, com hiperemia e edema, e pequeno acúmulo de células inflamatórias. No parênquima subjacente observa-se foco de lesão (fig. H) exibindo grau moderado de vacuolização citoplasmática, com presença de células com núcleo picnótico, compatíveis com morte/apoptose celular e alterações celulares como picnose.

5.6.5 – Resposta imune no cérebro e soro de camundongos C57B/6, IFN- γ -/- e TNFr p55 -/-, após infecção intracraniana, com Dengue virus 3 375(MG) genótipo I.

Entre o oitavo e o décimo segundo dias, após a infecção intracraniana, camundongos das diferentes linhagens, moribundos, inoculados com DENV-3 375(MG) I, foram sacrificados. O cérebro e o soro foram retirados, processados e então realizado o ensaio “Cytometric Bead Assay” (CBA-BD™), conforme protocolo modificado. A aquisição dos dados foi quantificada pela fluorescência das esferas por citometria de fluxo para as citocinas IL-6, IL-12, IL-10, TNF- α e IFN- γ , e a quimiocina, MCP-1, marcadores de uma resposta imune celular - inflamatória - efetiva contra o dengue 3 375(MG) I (figura 40).

Desta forma, foi observado nas análises dos dados, que nos cérebros dos animais C57Bl/6 infectados com o DENV-3 375(MG) I, houve aumento significativo, * $p < 0.05$, na produção nas citocinas TNF- α (figura 40A) e em MCP-1(39E) em relação aos C57B/6 não infectados. Já para as análises séricas obteve-se uma aumento nos níveis de TNF- α (figura 40B), IFN- γ (40D) e MCP-1(40F) somente nos animais selvagens. Contudo, os animais deficientes (IFN- γ e TNFr p55) foram incapazes de produzir diferenças aumentos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) nos níveis das citocinas e quimiocina quando foram comparados os níveis do camundongos inoculados com os controles, no cérebro e soro (figura 40 A – 40F).

No cérebro e soro de alguns animais C57Bl/6 e de nocautes (IFN- γ e TNFr p55) estudados não foram detectados níveis para as citocinas e quimiocina analisadas (figura 40 e 41 - **n.d.**). Em nenhum dos animais testados foram detectados produção de IL-12 no soro e nos cérebros destes animais.

O aumento dos níveis das citocinas IL-6 (figura 41A e 41B) e IL-10 (41C e 41D) também foi detectado. No entanto, somente nos cérebros dos animais IFN- γ -/- inoculados com o DENV-3 375(MG) I comparados aos animais

controle, esses valores foram significativos com um $**p < 0,01$ para IL-6 e $*p < 0,05$ para IL-10.

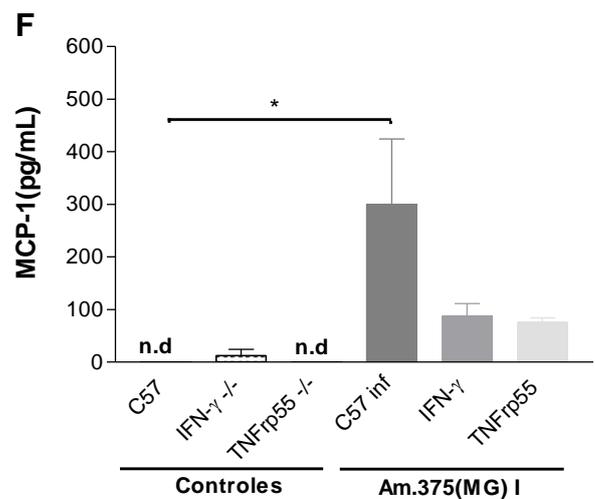
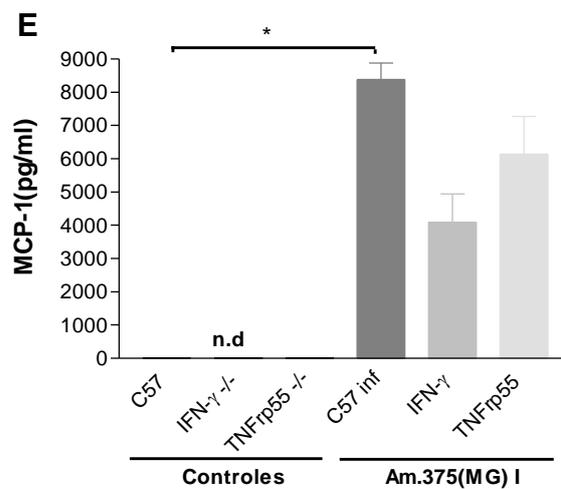
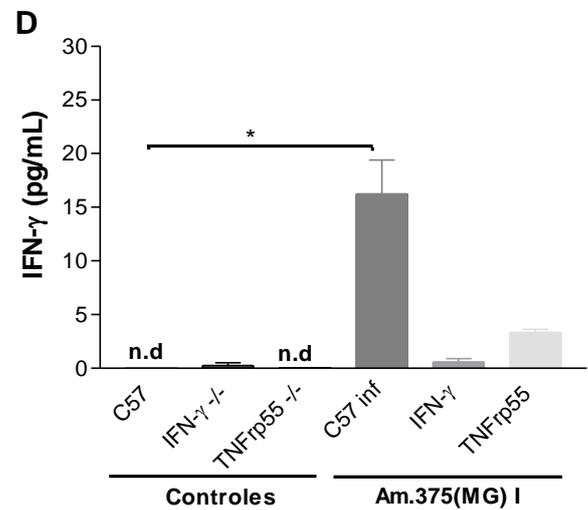
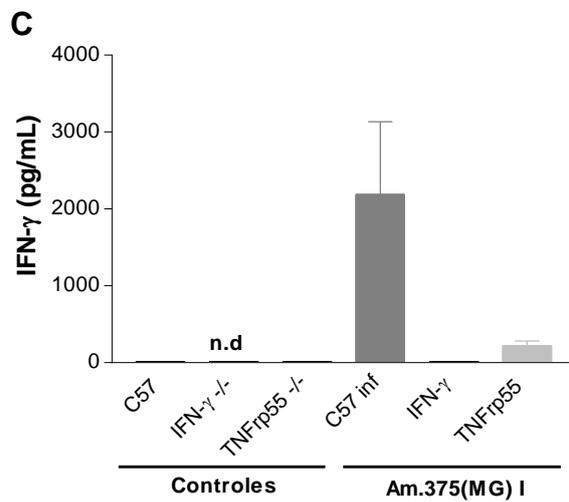
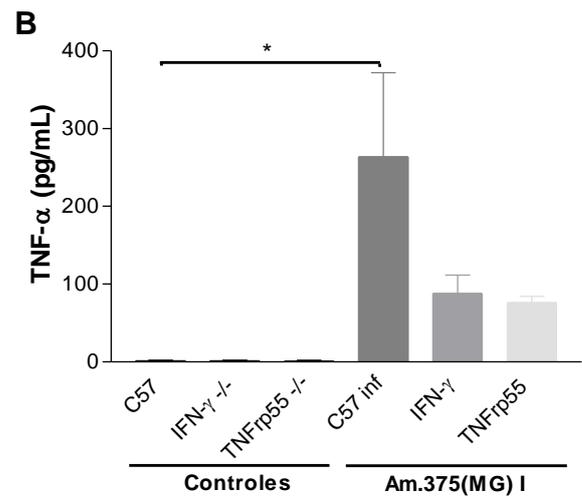
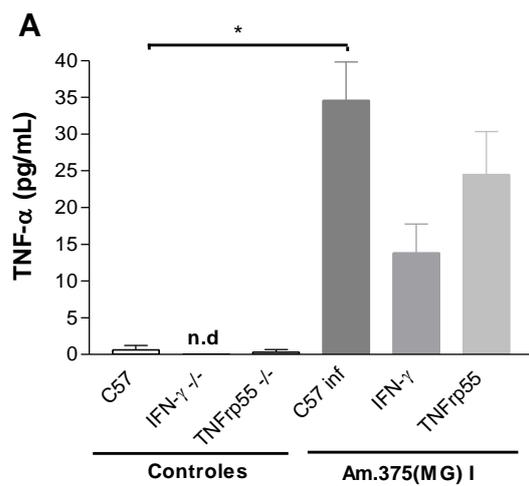


Figura 40: Resposta imune inflamatória no cérebro e soro de camundongos com o *Dengue virus 3 375(MG)* genótipo I, via I.C., entre o 8º e 12º dia p.i. Os animais C57BL/6 foram inoculados com DENV-3 375(MG) I, com 40 p.f.u., os animais controles foram inoculados com 20µl de L-15. Os camundongos foram sacrificados, no 8º e o 12º dia p.i., com sinais avançados de encefalite e os cérebros e soros foram obtidos e processados. Foram dosadas no cérebro as citocinas TNF-α (A), IFN-γ (C) e a quimiocina MCP-1(E) e no soro as citocinas TNF-α (B), IFN-γ (D) e a quimiocina MCP-1(F), através do sistema CBA (Mouse Inflammation Kit – BD™) e a aquisição por citometria de fluxo. O mínimo de seis animais infectados por grupo foi utilizado no experimento. As análises estatísticas foram feitas através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns e as barras representam o S.E.M, ou erro médio. * p < 0,05. N.d – não detectado. Am=amostra.

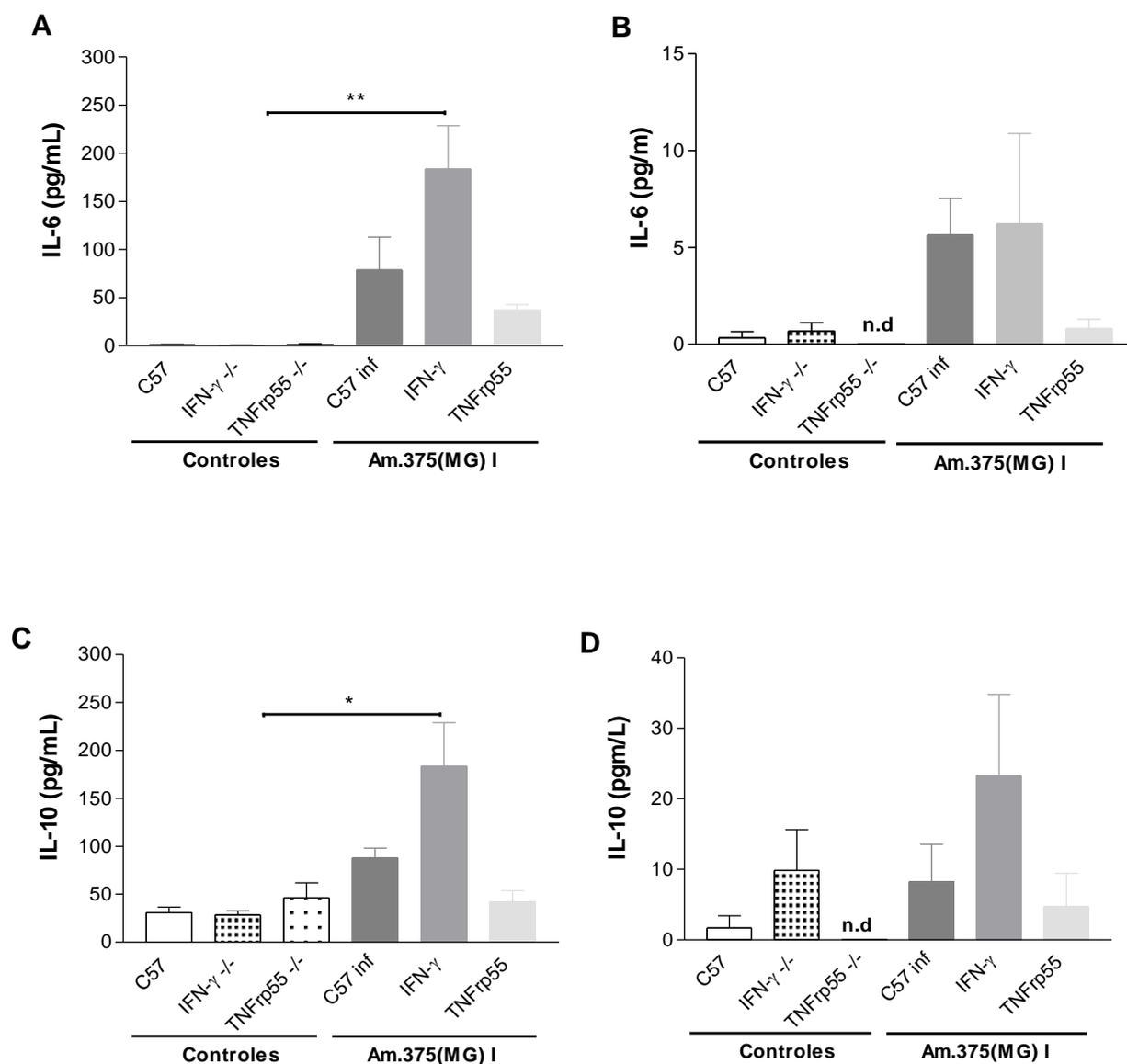


Figura 41: Resposta imune inflamatória no cérebro e soro de camundongos com o *Dengue virus 3 375(MG) genótipo I*, via I.C., entre o 8º e 12º dia p.i. Os animais C57BL/6 foram inoculados com DENV-3 375(MG) I, com 40 p.f.u., os animais controles foram inoculados com 20 μ l de L-15. Os camundongos foram sacrificados, no 8º e o 12º dia p.i., com sinais avançados de encefalite e os cérebros e soros foram obtidos e processados. Foram dosadas no cérebro as citocinas IL-6 (A) e IL-10 (C) e no soro as citocinas IL-6 (B) e IL-10 (D), através do sistema CBA (Mouse Inflammation Kit – BDtm) e a aquisição por citometria de fluxo. O mínimo de seis animais infectados por grupo foi utilizado no experimento. As análises estatísticas foram feitas através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns e as barras representam o S.E.M, ou erro médio. * p < 0,05. N.d – não detectado. Am=amostra.

VI- DISCUSSÃO

O *Dengue virus* é agente da principal doença causada por mosquitos, e recentemente, com uma grande emergência nas áreas tropicais e subtropicais, onde abrange 100 países e uma população de mais de dois bilhões de pessoas habitando áreas endêmicas.

A infecção em humanos com alguns dos sorotipos do DENV pode resultar em manifestações clínicas, que vão desde uma infecção inaparente ou uma resposta febril leve até uma doença grave com hemorragias (FHD) levando a um quadro de síndrome do choque (SCD) (Halstead, 2007). Uma das manifestações pouco comuns na infecção por dengue é o envolvimento do sistema nervoso central.

Nas últimas seis décadas de estudos de patogênese, pouco se tem avançado, pois não existe modelo animal ideal, sendo que mesmo os primatas não humanos não apresentam sinais de doença após a inoculação do vírus (Rico-Hesse, 2007). Recentemente, duas diferentes abordagens para obter um modelo murino susceptível têm sido estudadas. Dentre estas, a indução de doença em camundongos imunocompetentes similar àquela que é observada em humanos e a utilização de camundongos nocautes ou imunodeficientes que são transplantados com células humanas para mimetizar a doença em humanos tem sido empregados (Bente & Rico-Hesse, 2006).

Neste estudo amostras de DENV isoladas de pacientes foram empregadas para avaliar a virulência em modelo murino. As amostras foram multiplicadas e os títulos obtidos foram de 2×10^5 a 2×10^7 p.f.u./mL. O protocolo combina precipitação por PEG e sedimentação em gradiente descontínuo de tartarato de potássio. Ao redor das partículas virais foi visualizada uma suspensão de tartarato de potássio e isto deve interferir na qualidade da amostra. Diante do exposto, os protocolos descritos para purificação do DENV são escassos e a obtenção de amostra purificada após as várias etapas tem títulos virais relativamente baixos. Contudo, a purificação do DENV é importante nos estudos imunológicos de interação parasita-hospedeiro e sinalização celular. A purificação das partículas virais de DENV-2 foi feita como descrito por Kuhn *et al.*, 2002. Utilizando a microscopia de força atômica

(descrito por Binning e colaboradores, 1986) a integridade e pureza das partículas do DENV foi visualizada. Foram contadas 120 partículas que possuíam um diâmetro médio de $55\text{nm} \pm 10,22\text{nm}$ (figura 5) (Lindenbach *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 2002). Diante do diâmetro obtido podemos sugerir que as partículas visualizadas são em sua maioria maduras, pois segundo Zhang e colaboradores, 2003 que utilizaram de microscopia crio-eletrônica foi demonstrado que partículas imaturas possuem um diâmetro de 60nm devido à estrutura conformacional das proteínas virais. Imagens de alta resolução abaixo de 500 nanômetros, e mostram a morfologia esférica das partículas de DENV-2 após purificação. A 18°C foram visualizadas estruturas semelhantes a “cordões grossos” como descrito por Kuznestov & McPherson, 2006. Estas estruturas expostas para a porção exterior das partículas seria o ácido nucléico componente do vírus, RNA, que após ocorrer sua extrusão adquire uma conformação circular com frequência (figura 7). Foram feitas medidas do RNA extruído, e as medidas de espessuras do RNA corroboram os resultados obtidos por Kuznestov *et al.*, 2005. Este fenômeno também foi observado por Alvarez e colaboradores, 2005, que mostraram que a circularização do RNA viral seria uma estratégia para replicação do ácido nucléico.

Após a caracterização das amostras estas foram empregadas para estabelecer o modelo murino. Inicialmente, camundongos BALB/c com duas semanas de idade, foram inoculados em três diferentes vias: i.p., i.c. e i.v., com dose de $1,5 \times 10^4$ p.f.u do *Dengue virus 2*. No 10º dia p.i., os animais inoculados via i.c. apresentaram encefalite com sinais característicos conforme, figura 8. Nestes camundongos foi possível encontrar o DENV-2 no cérebro. Os animais inoculados pelas outras vias não apresentaram alterações. Na literatura são descritos sinais de paralisia e morte em camundongos com imunodeficiência - nocautes ou SCID - (Lin *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999) ou alguns modelos houve a inoculação destes animais com o DENV adaptado (Johnson & Roehrig 1999). Meiklejohn e colaboradores 1952 e, recentemente, Bordignon e colaboradores, (2007) descreveram que o DENV se multiplicava em cérebro de camundongos neonatos quando inoculados via i.c..

Foram também comparados os sinais clínicos - encefalite - em duas linhagens diferentes de camundongos BALB/c e C57B/6, com 2 semanas, quando foram inoculados por 3 vias com dose de $1,5 \times 10^4$ p.f.u do DENV-2. Corroborando o resultado anterior as duas linhagens de animais inoculados, pela via i.c., apresentaram sinais clínicos característicos de encefalites virais com perda de peso e mortalidade (figura 5) similar ao descrito por Huang *et al.*, 2000 Athrasheukaya *et al.*, 2003, e recentemente por Bordignon *et al.*, 2007. Foram detectados vírus nos cérebros das duas linhagens de camundongos infectados com títulos de 9×10^3 e 2×10^4 p.f.u./mL, respectivamente. Os camundongos inoculados pelas outras vias não apresentaram alterações. Em nossos estudos, animais C57BI/6 foram empregados, já que ambas as linhagens apresentavam morbidade e mortalidade similares e estes eram da mesma linhagem dos animais imunodeficientes a serem empregados.

Camundongos C57BI/6, 2 semanas, foram inoculados com isolados humanos DENV-1 109(FD) e DENV-3 375(MG-FHD), via i.c., com uma dose de 4×10^3 p.f.u.. Estas amostras DENV- 1 e 3 foram isoladas de pacientes com sintomatologia clínica de FD e FHD, segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS). Os camundongos inoculados com DENV-1 permaneceram sem alterações, sem perda de peso até o 20º dia p.i. e sem mortalidade, e os animais inoculados com o DENV-3 morreram entre o 6º e o 7º dia p.i. (figura 10), com sinais como paralisia de membros, espasmos e tremores, arqueamento do dorso, piloereção, cegueira dentre outros (figura 8). Estas duas amostras de 2 sorotipos diferentes, apesar de serem isoladas na região metropolitana de Belo Horizonte durante epidemia ocorrida entre os anos de 2002 e 2004, demonstraram uma virulência diferenciada, o que pode ser um reflexo das possíveis diferenças estruturais em seu genoma (Leitmeyer *et al.*, 1999)

Com intuito de verificar se em animais acima de duas semanas de idade haveria alterações com sinais de encefalite com o DENV-3 375(MG) I e se este isolado seria capaz de gerar sinais e mortalidade como observado anteriormente em animais de 2 semanas, foram feitas inoculações, via i.c., em camundongos adultos com 5 semanas. A mesma dose foi inoculada em

animais de 5 semanas. Todos os animais morreram, no 8º dia p.i., sendo portanto um pouco retardada a mortalidade quando comparada aos animais mais jovens (figura 10).

Para determinar a virulência desta amostra de DENV-3, com diferentes concentrações virais camundongos C57B/6 foram inoculados com 4×10^3 p.f.u. ou 4×10^2 p.f.u./camundongo. Todos os animais inoculados com DENV-3 375(MG) I com ambas as doses morreram, no entanto os animais inoculados com a dose de 4×10^2 p.f.u. apresentaram uma sobrevivência maior (24 horas) comparado aos animais inoculados com 4×10^3 p.f.u.(figura 11).

C57B/6 foram também inoculados inoculações pelas vias i.p., i.v., i.d. e s.c., com as doses de 4×10^2 e 4×10^3 p.f.u./camundongo. Após 20 (vias **i.d.** e **s.c.**) e 35 dias p.i. (vias **i.p.** e **i.v.**) nenhum dos animais apresentou sinais clínicos, demonstrando que a amostra de DENV-3 375(MG) I só gera encefalite nos camundongos inoculados via i.c..

No intuito de estabelecer uma infecção secundária, por via i.c., tendo em vista que todos os animais C57B/6 foram susceptíveis as inoculações intracranianas, estes camundongos inoculados pelas vias i.p. e i.v. foram reinoculados, via i.c., com dose de 4×10^2 p.f.u. da amostra DENV-3 375(MG) I. Os animais inoculados i.p. e reinoculados, via i.c., apresentaram os sinais iniciais de encefalite, mais tardiamente, com mortalidade de 100%. No entanto, os animais inoculados via i.v. e reinoculados, via i.c., a mortalidade foi de 25%. Estes resultados indicam haver uma proteção desenvolvida nos camundongos inoculados por via i.p. e não pela via i.v..

Após a determinação da via de inoculação e dose da amostra DEN-3 375(MG) I em camundongos C57B/6, foi feita a inoculação por via i.c. de DENV-1 e DENV-3 isolados de pacientes com manifestações clínicas de FD e FHD de amostras oriundas de isolados humanos. Similar ao ocorrido com os camundongos inoculados com o DEN-3 375(MG) I, os camundongos inoculados com a amostra de DENV-3 25(MG) I apresentaram os mesmos sinais de encefalite culminando com óbito de 100% destes até o 8º dia p.i.

(figura 12). Os camundongos inoculados com as amostras DENV-1 109(FD) e DENV-1 240(FHD) não apresentaram sinais clínicos (figura 12). Este dado corrobora com nosso experimento anterior, ressaltando a diferença entre as amostras de DENV-1 e DENV-3 e suas conseqüentes virulências. As amostras de DENV-3 foram caracterizadas como sendo genótipo I, conforme Lanciotti e colaboradores, (1994).

Desta forma nos camundongos inoculados com as amostras DENV-3 que apresentaram sinais clínicos, foi feito o hemograma completo do sangue periférico, no 7º dia p.i., no leucograma foi detectado a leucopenia e granulocitopenia em relação aos controles (figuras 13 e 15, respectivamente). Foi também detectada uma diminuição no número de linfócitos (figura 14), poderá ser explicada pelo fato que o número percentual dos linfócitos nos PBMC de camundongos C57B/6 representa de 75-90% do total de leucócitos, diferindo dos valores normais em humanos (Doeing *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos no eritrograma ((tabela 6) e os índices hematológicos (VCM, HCM e CHCM) (tabela 7) dos animais inoculados com ambas as amostras DENV-3 não indicaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para entender o curso da infecção, foi feita uma cinética de infecção no 2º, 4º e 6º dias p.i. os animais inoculados, via i.c., com dose de 4×10^2 p.f.u. com a amostra do DEN-3 375(MG) I. Assim, nos dias assinalados anteriormente, foram avaliados os títulos virais nos órgãos (tabela 8) e as análises do sangue periférico destes animais (figuras 16 e 17).

As partículas virais infecciosas foram detectadas no cérebro a partir do 4º dia p.i., com título de 3×10^3 p.f.u., e no 6º dia p.i., com título de 2×10^6 p.f.u. Estes resultados demonstram que ocorre a multiplicação do DENV-3 375(MG) I no cérebro, confirmando a evolução da infecção e o agravamento dos sinais clínicos, que já podem ser verificados no 6º dia p.i.. Em relação, aos demais órgãos titulados (pulmão, baço, fígado), não foram detectados partículas virais infecciosas e também não foi observada viremia sérica (ver tabela 8).

Durante a infecção por dengue em humanos ocorre na fase aguda com frequência leucopenia, caracterizada por neutropenia (Kalayanarooj *et al.*, 1997; Ali, *et al.*, 2007). Poucos dados estão disponíveis sobre análises sanguíneas de animais inoculados com amostras isoladas de pacientes com DENV. Foi feita as análises do sangue total dos camundongos infectados, do 2º ao 6º dia p.i., com o isolado DENV- 3 375(MG) I. Nestes animais a partir do 2º d.p.i., houve redução significativa no número de leucócitos, que se manteve até o 6º dia p.i. (figura 16). A contagem de linfócitos também o mesmo perfil de análise anterior (figura 17). Quando o número de leucócitos totais e linfócitos foram analisados, os dados corroboram os resultados obtidos na titulação viral. Os animais inoculados com DENV-3 375(MG) I entre o 2º e 6º dia p.i. apresentaram um aumento no título viral no cérebro entre o 2º e 6º d.p.i. (tabela 8) e ocorre um efeito antagônico no número de leucócitos gerando uma leucopenia (figura 16), e uma linfopenia periféricas (figura 17).

Estudos de Cologna e colaboradores, 2003, mostraram através de construções de quimeras, que o genótipo americano (IQT2913) possui menor capacidade de multiplicação em macrófagos derivados de monócitos (MDM) e células dendríticas primárias humanas em relação a genótipo do sudeste asiático (16681). Em 2005, o mesmo grupo, descreve que este último genótipo apresentaria um maior pontencial de causar FHD, uma vantagem seletiva frente ao genótipo americano, por gerar elevada viremia no hospedeiro humano e infectar em maior proporção os mosquitos vetores.

Recentemente, Figueiredo e colaboradores, 2008 descrevem amostras de *Dengue virus* 3 genótipo I em uma epidemia na região metropolitana de Belo Horizonte caracterizada por ter grande potencial de causar doença grave. Este genótipo foi agrupado no clado juntamente com amostras asiáticas com base na análise de das regiões do gene C-prM (504 nt) e de uma região mais variável do gene E (1023nt). Ainda, em 2007, uma amostra DENV-3 foi isolada de uma epidemia no Piauí e foi agrupada como genótipo III (Lanciotti *et al.*, 1994). Estas amostras tiveram regiões do gene C e prM amplificadas e na comparação do seqüenciamento apresentaram, em 1182 nt, diferenças em 51 nt.

A virulência das amostras em camundongos C57Bl/6 foi analisado sendo os camundongos inoculados com a amostra do genótipo III não apresentaram sinais clínicos nem alterações hematológicas (figura 20, 21 e 22). Análises histopatológicas mostraram que os cérebros de camundongos infectados com DENV- 3 375 (MG) I, apresentaram uma intensa e difusa meningoencefalite (figura 23C e 23E) com infiltrado inflamatório de mononucleares e intensas alterações vacuolares e degenerativas (fig. 23E-setas abertas). Foram observadas áreas sugestivas de morte celular por apoptose (fig. 23F-seta), o que corrobora dados de Desprès *et al.*, 1998. Recentemente Limonta *et al.*, 2007 mostraram que provavelmente há a contribuição *in vivo* de apoptose na patofisiologia da FHD/SCD. Observa-se ainda áreas de reatividade vascular com intensa inflamação dos vasos (fig, 23D e 23F-cabeça de seta) e áreas de edema acentuado de meninges acentuada (fig. 23E- seta larga).

Os aspectos histopatológicos do cérebro dos animais com amostra DENV- 3 64(MG) III foram característicos de uma infecção no cérebro, entretanto as microfotografias de meninge e encéfalo apresentam apenas discretas alterações. Foi observada uma meningite discreta com edema e descolamento focal das meninges (figura 23G-seta larga). Apresentaram vasos congestionados com discreta presença de células mononucleares (fig. 23H-cabeça de seta).

Baseados nos resultados obtidos através das análises histopatológicas e os dados da literatura que relatam a ocorrência de encefalites por DENV (Solomon *et al.*, 2000; Miagostovich *et al.*, 1997 e 2006), o acometimento de células nervosas, astrócitos e micróglia (Ramos *et al.*,1998) e lesões no cérebro similares as que foram descritos (Sánchez-Burgos *et al.*, 2004; Bordignon *et al.*, 2007) podemos sugerir que o DENV-3 375(MG) I é um isolado que apresenta neurovirulência para camundongos. Este modelo de infecção via i.c., mostra que isolados de mesmo sorotipo, porém de diferentes genótipos, em modelo animal apresentam virulência diferentes.

Várias citocinas e quimiocinas estão envolvidas na imunopatogênese do DENV (FHD/SCD) *in vitro* e *in vivo*, com elevados níveis circulantes de TNF- α

produzidos por monócitos (Espina *et al.*, 2003), em camundongos BALB/c (Atrasheuskaya *et al.*, 2003), IFN- γ (Diamond *et al.*, 2000), IL-4, IL-5 (Chatuverdi *et al.*, 1999), IL-6 e RANTES (Lee *et al.*, 2006), IL-10 (Chen *et al.*, 2006; Green *et al.*, 1999) e MCP-1 (Lee *et al.*, 2006). Além destes fatores, há ainda descrição de apoptose como mecanismo pelo qual o DENV deve causar morte celular (Navarro-Sánchez *et al.*, 2005).

No intuito de determinar padrão da resposta imune inflamatória na infecção por DENV-3 a presença de um conjunto de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e IL-12) e a quimiocina MCP-1 (CCL-2) foram analisadas. Camundongos C57B/6 foram inoculados, via i.c., com as duas amostras do DENV-3, e após o 7^o dia p.i. a presença de citocinas foi analisada no cérebro e soro destes camundongos, através da técnica CBA. Foi detectada nos cérebros dos animais infectados com o DENV-3 375(MG) I, um aumento significativo nos níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-10 e de MCP-1. Contudo, os cérebros dos camundongos inoculados com o DENV-3 64(PI) III ou não houve detecção de níveis mínimos das citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-6) ou sua produção não foi significativa quando comparado aos controles (IL-10 e MCP-1) (figura 24).

A resposta inflamatória foi avaliada através da produção elevada das citocinas (IFN- γ e IL-6) e de MCP-1 no soro de animais inoculados DENV-3 375(MG) I comparado aos soros controles. Contudo, os níveis da citocina anti-inflamatória, IL-10, não foram detectáveis nos soros de animais analisados.

De acordo com os resultados, podemos sugerir que no cérebro dos animais com o DENV-3 375(MG) I há produção significativa de citonas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6, e estas associadas ao sistema nervoso central causam neuropatologias. Visto que, a via de infecção no modelo utilizado, é intracraniana e as células alvo do DENV-3 podem ser macrófagos teciduais do cérebro - micróglia, que por sua vez, estão descritas como células onde o vírus pode se multiplicar (Ramos *et al.*, 1998) e são capazes de produzir citocinas TNF- α , NO, IFN- α e IL-6 (Marianneau *et al.*, 1999).

Em 2004, Pérez e colaboradores descreveram que IL-10 está presente no soro de pacientes com FHD, e que o aumento dos níveis desta citocina sugere o seu papel na patogênese da dengue. Contudo, como descrito em estudos (Pacsa *et al.*, 2000), os níveis de IL-12 não diferem entre pacientes com FHD e controles. Desta maneira, a deficiência de IL-12 em pacientes com FHD, altera a resposta celular Th₁ para Th₂, resultando em um agravamento da doença e morte de pacientes (Chaturverdi *et al.*, 1999). Quanto a MCP-1, está descrita como sendo secretada por monócitos e linfócitos infectados por DENV-2, é candidata a modular a permeabilidade vascular em pacientes com FHD/SCD (Lee *et al.*, 2006). Os níveis detectáveis desta quimiocina no cérebro de camundongos, ser decorrente do intenso infiltrado inflamatório por mononucleares e da permeabilidade vascular neste órgão.

Os interferons desempenham um papel importante na eliminação dos vírus, e o pré-tratamento dos IFN tipo I inibe a replicação dos vírus, via PKR (Diamond *et al.*, 2000). IFN- γ é descrito como fundamental por desempenhar um papel antiviral precoce na proteção contra a infecção pelo *West Nile virus* (Shrestha *et al.*, 2006). Esta citocina, que é marcadora de ativação de células T, está presente em altos níveis no soro de crianças com FHD comparadas as com FD (Green *et al.*, 1999).

Foi avaliado se o aumento das doses inoculadas de DENV-3 64(PI) III nos camundongos (de 4×10^2 a 4×10^5 p.f.u.) causaria o aparecimento de sinais clínicos, e somente nos cérebros de animais inoculados com 4×10^5 p.f.u. foram detectados partículas virais, contudo estes animais não apresentaram sinais clínicos.

A gravidade das lesões patológicas acompanhou as doses inoculadas sem que alterações mais acentuadas fossem encontradas com uma leptomeningite.

O papel da resposta imune inata na infecção de camundongos com a amostra DENV-3 375 (MG) I foi estudada em camundongos C57B/6 deficientes em genes relacionados à resposta imune inata (IFN- γ , TNF α p55 e iNOS). Os

camundongos IFN- γ -/- inoculados com o DENV-3 apresentaram sinais de encefalite foram antecipados em relação aos animais selvagens, entretanto, todos os animais das duas linhagens, C57B/6 e IFN- γ -/-, morreram à infecção no oitavo dia p.i. (figura 29) e o vírus foi detectado no cérebro dos animais (tabela 10). Os resultados obtidos discordam da literatura, pois Johnson & Roehrig, (1999) descrevem que camundongos deficientes em IFN- γ após a infecção com DENV-2 amostra adaptada (New Guinea C) há uma mortalidade baixa ou nenhuma. Shrestha e colaboradores, (2004) observaram o mesmo padrão com inoculações de um DENV- 2 (isolado humano não adaptado). Além que, deve considerar a virulência da amostra DEN-3 375(MG) I, pois em pequenas doses, 4×10^2 p.f.u. camundongos apresentam mortalidade de 100%.

Em camundongos IFN- γ -/- não foi detectada leucopenia e linfopenia (figura 30). Os animais deficientes para IFN- γ foi observado uma meningite com infiltrado de células com predominância de mononucleares na leptomeninge, manguitos perivascular com presença de células inflamatórias e áreas de encefalite. Assim nas micrografias do cérebro de animais IFN- γ -/- existe um acometimento difuso e agudo similar ao ocorrido nos C57B/6, porém com tendência a uma maior gravidade, apesar de não termos quantificado, sugerindo que a falta da molécula (IFN- γ) deve ser importante. Entretanto, isto não refletiu para sinais clínicos e mortalidade (figura 29).

As análises histopatológicas de pulmões mostraram alterações similares com espessamento de septos, congestão de vasos e pneumonia intersticial (figura 33), contudo estas alterações devem ser de origem secundária, e talvez, não sendo resultante de ação viral direta, visto que não foram detectados vírus neste órgão.

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória multifuncional e está, intimamente, relacionada com imunopatogênese de formas graves de DENV (Chaturverdi, 2006). Para avaliar o papel de TNF- α foram feitos experimentos com camundongos deficientes em genes da via de sinalização de TNF-alfa. Desta

forma, camundongos TNFr p55 $-/-$, deficientes no receptor p55KDa de TNF- α , foram inoculados, via i.c., com 4×10^2 p.f.u. da amostra DENV-3 375(MG) I e apresentaram um retardo na mortalidade de camundongos TNFr p55 $-/-$ comparados aos C57B/6, que pode ser parcialmente devido ao controle tardio da carga viral no SNC (Camelo *et al.*, 2000), sendo que houve detecção viral no cérebro (tabela 11). Os animais apresentaram uma leucopenia e linfopenia significativa. Pinto e colaboradores, (1999) descrevem que TNFR p55 e TNFR p75 são elevados em 42 e 84%, respectivamente, em pacientes com manifestações de DENV.

Para entender o papel da enzima sintetase óxido nítrico indutível (iNOS) e foram usados camundongos iNOS $-/-$. Estes animais deficientes para iNOS apresentaram o curso da infecção semelhante aos animais TNFr p55 $-/-$, com retardo na mortalidade (figura 37). Está descrito que quando a enzima iNOS é inibida ou utiliza-se camundongos geneticamente deficientes infectados por infectados por diferentes agentes virais (EMCV, HSV-1, Influenza vírus) e o flavivirus MVEV, o dano patológico é significativamente reduzido (Akaike & Maeda, 2000).

Detalhes de encefalite são descritos por Camelo e colaboradores (2000) caracterizados para o vírus rábico onde observa-se espasmos, falta de controle motor, paralisia das patas posteriores e piloereção. Estas alterações foram observadas nos IFN- γ $-/-$, TNFr p55 e iNOS $-/-$ infectados pelo DENV, sendo além disso observadas alterações difusas e lesões irreversíveis nas micrografias de histopatologias dos cérebros de animais infectados (figura 23 e 32), detecção de partículas virais no cérebro, leucopenia, neutropenia e detecção no cérebro de citocinas implicadas na imunopatogênese como TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e a quimiocina MCP-1.

Testes reduzindo a dose para 4×10 p.f.u. mostraram que todos os animais morreram com um retardo de 48 horas (figura 38).

Em todos os animais foi observado uma meningoencefalite difusa com intenso infiltrado inflamatório caracterizado por mononucleares, edema dentre outros. Estes dados em conjunto com os dados de mortalidade dos animais nos indicaram que o cérebro poderia ter níveis significativos de citocinas e quimiocinas que estão relacionadas à imunopatogênese do DENV. É descrito que infecções virais no SNC levam a produção de citocinas e moléculas inflamatórias como IL-1 α/β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFNs e NO e secreção de quimiocinas (Benveniste *et al.*, 1997, 1998; Glabinski & Ransohoff, 1999).

Em camundongos infectados com DENV-3 375(MG) I foram detectados aumentos, estatisticamente significativos na produção de TNF- α , MCP-1, IL-6 e IL-10, respectivamente, entre o 8 e o 12º, após a infecção (figura 40 e 41). Estes dados corroboram a importância das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 em processos inflamatórios no SNC de camundongos, C57B/6 e TNFr p55. Não houve produção significativa de IFN- γ no cérebro de nenhuma das linhagens de camundongos infectados com o DENV-3 inoculados com 40 p.f.u.. quando a infecção foi com a dose de 4×10^2 p.f.u. houve aumento na produção de IFN- γ (figura 24B). A produção significativa de IL-10 no cérebro de camundongos deficientes para IFN- γ infectados é explicada na literatura que mostra que as citocinas, TNF- α e IFN- γ , atuam controlando a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10. IL-6 é um marcador de inflamação aguda e está implicada em danos teciduais o que corrobora com nossos dados histológicos no cérebro de animais IFN- γ -/-.

MCP-1 é uma quimiocina atraente de monócitos e relaciona-se com processos inflamatórios, recrutando mononucleares para locais lesados, pode ser observado o que ocorre no cérebro dos animais C57B/6 e deficientes em achados histológicos. Quanto à detecção dos níveis de citocinas e MCP-1 no soro dos animais C57B/6, IFN- γ e TNFr p55 -/- infectados com o DENV-3, foi detectado produção aumentada, estatisticamente, significativa (* $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$) das citocinas TNF- α , IFN- γ , e de MCP-1 em animais C57B/6 (figura 40B, 40D e 40F). Para a detecção das citocinas IL-6 e IL-10 no soro das linhagens testadas, não houve aumento da produção. Hober *et al.*, 1993,

descreveram detecção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 foram detectadas em pacientes Asiáticos com FHD/SCD durante infecção por DENV-3.

Tendo em vista os resultados de diferenças na virulência de amostras em modelo murino, estudos posteriores serão necessários para avaliar a virulência de um maior número de amostras de vírus isolados de pacientes com manifestações de FHD. Além disso, nosso modelo indica a importância de TNF- α e INOS para uma evolução retardada ao óbito, o que pode ser fundamental nos casos de FHD.

VII – CONCLUSÕES

AFM se mostrou como uma importante ferramenta para visualizar e obter informações quanto à pureza e morfologia das partículas virais, gerando imagens de alta resolução de partículas esféricas com diâmetro de 55nm e sendo possível mostrar a extrusão do RNA viral linear e circularizado.

- Camundongos C57B/6 adultos inoculados via intracerebral apresentaram mortalidade de 100% com quadro de meningoencefalite quando infectados com a amostra isolada de pacientes com DENV-3 genótipo I até mesmo com doses de 40 p.f.u em animais com 2 semanas de idade ou adultos, e não apresentaram mortalidade quando infectados com a amostra DENV-3 375(MG) genótipo III e DENV-1 com doses de até 4×10^5 p.f.u.
- Camundongos C57B/6 adultos inoculados via intracerebral com a amostra isolada de paciente DENV-3 genótipo I apresentaram leucopenia e granulocitopenia a partir do segundo dia de infecção, com aumento das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-10 e a quimiocina MCP-1 no cérebro entre 8^o e 12^o dia.
- Foi possível diferenciar características de virulência das amostras para camundongos, não sendo possível relacionar esta virulência com os casos de FD e FHD humanos.

- Camundongos iNOS $-/-$, TNF α $-/-$ apresentaram um retardo na mortalidade e os IFN- γ $-/-$ uma mortalidade mais rápida na infecção com DENV-3 genótipo I.
- As citocinas IL-6 e IL-10 se encontram aumentadas em cérebros de camundongos IFN- γ $-/-$ infectados com DENV-3 genótipo.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akaike, T., and Maeda, H. (2000): Nitric oxide and virus infection. *Immunology* **101**, 300-8.

Akira, S. (2004): Toll receptor families: structure and function. *Semin Immunol* **16**, 1-2.

Akira, S., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993): Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* **54**, 1-78.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-8.

Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Luduena, S. J., Pietrasanta, L. I., and Gamarnik, A. V. (2005): Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol* **79**, 6631-43.

Alvarez, D. E., Lodeiro, M. F., Luduena, S. J., Pietrasanta, L. I., and Gamarnik, A. V. (2005): Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol* **79**, 6631-43.

An, J., Kimura-Kuroda, J., Hirabayashi, Y., and Yasui, K. (1999): Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology* **263**, 70-7.

Anderson, K. V., Jurgens, G., and Nusslein-Volhard, C. (1985): Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* **42**, 779-89.

Anderson, R., Wang, S., Osioy, C., and Issekutz, A. C. (1997): Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol* **71**, 4226-32.

Atrasheuskaya, A., Petzelbauer, P., Fredeking, T. M., and Ignatyev, G. (2003): Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**, 33-42.

Ayala, A., Wang, P., Ba, Z. F., Perrin, M. M., Ertel, W., and Chaudry, I. H. (1991): Differential alterations in plasma IL-6 and TNF levels after trauma and hemorrhage. *Am J Physiol* **260**, R167-71.

Azeredo, E. L., Zagne, S. M., Santiago, M. A., Gouvea, A. S., Santana, A. A., Neves-Souza, P. C., Nogueira, R. M., Miagostovich, M. P., and Kubelka, C. F. (2001): Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* **204**, 494-507.

Bente, D. A., and Rico-Hesse, R. (2006): Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models* **3**, 97-103.

Bente, D. A., Melkus, M. W., Garcia, J. V., and Rico-Hesse, R. (2005): Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol* **79**, 13797-9.

Benveniste, E. N. (1997): Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol* **69**, 31-75.

Bordignon, J., Strottmann, D. M., Mosimann, A. L., Probst, C. M., Stella, V., Noronha, L., Zanata, S. M., and Dos Santos, C. N. (2007): Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. *J Med Virol* **79**, 1506-17.

Borish, L. C., and Steinke, J. W. (2003): 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* **111**, S460-75.

Bowie, A., and O'Neill, L. A. (2000): The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* **67**, 508-14.

Camelo, S., Lafage, M., and Lafon, M. (2000): Absence of the p55 Kd TNF-alpha receptor promotes survival in rabies virus acute encephalitis. *J Neurovirol* **6**, 507-18.

Carr, J. M., Hocking, H., Bunting, K., Wright, P. J., Davidson, A., Gamble, J., Burrell, C. J., and Li, P. (2003): Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. *J Med Virol* **69**, 521-8.

Chakravarti, A., and Kumaria, R. (2006): Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res* **123**, 25-30.

Chaturvedi, U. C. (2006): Tumour necrosis factor & dengue. *Indian J Med Res* **123**, 11-4.

Chaturvedi, U. C., Dhawan, R., Khanna, M., and Mathur, A. (1991): Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. *J Gen Virol* **72** (Pt 4), 859-66.

Chen, J. P., Lu, H. L., Lai, S. L., Campanella, G. S., Sung, J. M., Lu, M. Y., Wu-Hsieh, B. A., Lin, Y. L., Lane, T. E., Luster, A. D., and Liao, F. (2006): Dengue virus induces expression of CXC chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate. *J Immunol* **177**, 3185-92.

Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., and Marks, R. M. (1997): Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* **3**, 866-71.

Clyde, K., Kyle, J. L., and Harris, E. (2006): Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* **80**, 11418-31.

Cologna, R., and Rico-Hesse, R. (2003): American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* **77**, 3929-38.

Deen, J. L., Harris, E., Wills, B., Balmaseda, A., Hammond, S. N., Rocha, C., Dung, N. M., Hung, N. T., Hien, T. T., and Farrar, J. J. (2006): The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* **368**, 170-3.

Despres, P., Frenkiel, M. P., Ceccaldi, P. E., Duarte Dos Santos, C., and Deubel, V. (1998): Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. *J Virol* **72**, 823-9.

Diamond, M. S., Roberts, T. G., Edgil, D., Lu, B., Ernst, J., and Harris, E. (2000): Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol* **74**, 4957-66.

Doering, D. C., Borowicz, J. L., and Crockett, E. T. (2003): Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol* **3**, 3.

Domingues, R. B., Kuster, G. W., Onuki-Castro, F. L., Souza, V. A., Levi, J. E., and Pannuti, C. S. (2007): Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci*.

Ertel, W., Morrison, M. H., Ayala, A., and Chaudry, I. H. (1995): Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release. *Am J Physiol* **269**, R160-6.

Espina, L. M., Valero, N. J., Hernandez, J. M., and Mosquera, J. A. (2003): Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* **68**, 48-53.

Figueiredo; L.B.; Cecílio, A.B.; Ferreira, G.P.; Drummond, B.P.; Oliveira, J.G.; Bonjardim, C.A.; Ferreira, P.C.P. and Kroon, E.G. (2008): Dengue virus 3 genotype 1 associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. *Emerg Infectious Disease* **14**, 314-316.

Fink, J., Gu, F., and Vasudevan, S. G. (2006): Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol* **16**, 263-75.

Glabinski, A. R., and Ransohoff, R. M. (1999): Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol* **5**, 3-12.

Gollins, S. W., and Porterfield, J. S. (1985): Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry. *J Gen Virol* **66 (Pt 9)**, 1969-82.

Gratz, N. G. (2004): Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* **18**, 215-27.

Green, S., and Rothman, A. (2006): Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* **19**, 429-36.

Green, S., Pichyangkul, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Kurane, I., Rothman, A. L., and Ennis, F. A. (1999): Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **180**, 1429-35.

Green, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Nisalak, A., Rothman, A. L., and Ennis, F. A. (1999): Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol* **59**, 329-34.

Gubler, D. J. (1998): Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* **11**, 480-96.

Gubler, D. J. (2002): Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* **10**, 100-3.

Gubler, D. J., Suharyono, W., Lubis, I., Eram, S., and Sulianti Saroso, J. (1979): Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. I. Virological and epidemiological studies. *Am J Trop Med Hyg* **28**, 701-10.

Gubler, D. J., Suharyono, W., Tan, R., Abidin, M., and Sie, A. (1981): Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull World Health Organ* **59**, 623-30.

Guzman, M. G., and Kouri, G. (2002): Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* **2**, 33-42.

Guzman, M. G., and Kouri, G. (2002): Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* **2**, 33-42.

Halstead, S. B. (1979): In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis* **140**, 527-33.

Halstead, S. B. (1988): Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* **239**, 476-81.

Halstead, S. B. (2003): Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* **60**, 421-67.

Halstead, S. B. (2007): Dengue. *Lancet* **370**, 1644-52.

Halstead, S. B., and O'Rourke, E. J. (1977): Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* **265**, 739-41.

Halstead, S. B., Lan, N. T., Myint, T. T., Shwe, T. N., Nisalak, A., Kalyanarooj, S., Nimmannitya, S., Soegijanto, S., Vaughn, D. W., and Endy, T. P. (2002):

Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. *Emerg Infect Dis* **8**, 1474-9.

Halstead, S. B., Streit, T. G., Lafontant, J. G., Putvatana, R., Russell, K., Sun, W., Kanesa-Thanan, N., Hayes, C. G., and Watts, D. M. (2001): Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* **65**, 180-3.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-9.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-5.

Henchal, E. A., and Putnak, J. R. (1990): The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* **3**, 376-96.

Hober, D., Delannoy, A. S., Benyoucef, S., De Groote, D., and Wattre, P. (1996): High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengue-infected patients. *Microbiol Immunol* **40**, 569-73.

Hober, D., Poli, L., Roblin, B., Gestas, P., Chungue, E., Granic, G., Imbert, P., Pecarere, J. L., Vergez-Pascal, R., Wattre, P., and et al. (1993): Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* **48**, 324-31.

Holmes, E. C., and Twiddy, S. S. (2003): The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* **3**, 19-28.

Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2005): Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol* **17**, 1367-78.

Hsieh, M. F., Lai, S. L., Chen, J. P., Sung, J. M., Lin, Y. L., Wu-Hsieh, B. A., Gerard, C., Luster, A., and Liao, F. (2006): Both CXCR3 and CXCL10/IFN-inducible protein 10 are required for resistance to primary infection by dengue virus. *J Immunol* **177**, 1855-63.

Huang, K. J., Li, S. Y., Chen, S. C., Liu, H. S., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Liu, C. C., and Lei, H. Y. (2000): Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol* **81**, 2177-82.

Imler, J. L., and Hoffmann, J. A. (2001): Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol* **11**, 304-11.

Jacobs, M. (2000): Dengue: emergence as a global public health problem and prospects for control. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**, 7-8.

Johansson, M., Brooks, A. J., Jans, D. A., and Vasudevan, S. G. (2001): A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol* **82**, 735-45.

Johnson, A. J., and Roehrig, J. T. (1999): New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J Virol* **73**, 783-6.

Kalayanarooj, S., Vaughn, D. W., Nimmannitya, S., Green, S., Suntayakorn, S., Kunentrasai, N., Viramitrachai, W., Ratanachu-ek, S., Kiatpolpoj, S., Innis, B. L., Rothman, A. L., Nisalak, A., and Ennis, F. A. (1997): Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis* **176**, 313-21.

Kawai, T., and Akira, S. (2007): Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem (Tokyo)* **141**, 137-45.

Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T.

S., and Strauss, J. H. (2002): Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**, 717-25.

Kurane, I., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Meager, A., and Ennis, F. A. (1993): High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg* **48**, 222-9.

Kurane, I., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Nisalak, A., Meager, A., Janus, J., and Ennis, F. A. (1991): Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest* **88**, 1473-80.

Kurt-Jones, E. A., Chan, M., Zhou, S., Wang, J., Reed, G., Bronson, R., Arnold, M. M., Knipe, D. M., and Finberg, R. W. (2004): Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1315-20.

Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., and Finberg, R. W. (2000): Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **1**, 398-401.

Kuznetsov, Y. G., and McPherson, A. (2006): Atomic force microscopy investigation of Turnip Yellow Mosaic Virus capsid disruption and RNA extrusion. *Virology* **352**, 329-37.

Kuznetsov, Y. G., Daijogo, S., Zhou, J., Semler, B. L., and McPherson, A. (2005): Atomic force microscopy analysis of icosahedral virus RNA. *J Mol Biol* **347**, 41-52.

Lanciotti, R. S., Gubler, D. J., and Trent, D. W. (1997): Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol* **78 (Pt 9)**, 2279-84.

Lanciotti, R. S., Lewis, J. G., Gubler, D. J., and Trent, D. W. (1994): Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* **75** (Pt 1), 65-75.

Lee, Y. R., Liu, M. T., Lei, H. Y., Liu, C. C., Wu, J. M., Tung, Y. C., Lin, Y. S., Yeh, T. M., Chen, S. H., and Liu, H. S. (2006): MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol* **87**, 3623-30.

Lei, H. Y., Yeh, T. M., Liu, H. S., Lin, Y. S., Chen, S. H., and Liu, C. C. (2001): Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* **8**, 377-88.

Leitmeyer, K. C., Vaughn, D. W., Watts, D. M., Salas, R., Villalobos, I., de, C., Ramos, C., and Rico-Hesse, R. (1999): Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* **73**, 4738-47.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-83.

Libraty, D. H., Endy, T. P., Hough, H. S., Green, S., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., Chansiriwongs, W., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Ennis, F. A., and Rothman, A. L. (2002): Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* **185**, 1213-21.

Limonta, D., Capo, V., Torres, G., Perez, A. B., and Guzman, M. G. (2007): Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol* **40**, 50-4.

Lin, Y. L., Liao, C. L., Chen, L. K., Yeh, C. T., Liu, C. I., Ma, S. H., Huang, Y. Y., Huang, Y. L., Kao, C. L., and King, C. C. (1998): Study of Dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. *J Virol* **72**, 9729-37.

Liu, B. H., Shen, F., Li, Y. T., Zhao, D. Y., and Cheng, G. F. (2003): [Effect of lipopolysaccharide on expression of interleukin-6 in human synoviocyte from patients with rheumatoid arthritis]. *Yao Xue Xue Bao* **38**, 420-3.

Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003): Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**, 513-20.

Mackenzie, J. S., Gubler, D. J., and Petersen, L. R. (2004): Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* **10**, S98-109.

Marianneau, P., Steffan, A. M., Royer, C., Drouet, M. T., Jaeck, D., Kirn, A., and Deubel, V. (1999): Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *J Virol* **73**, 5201-6.

Maruo, N., Morita, I., Shirao, M., and Murota, S. (1992): IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology* **131**, 710-4.

McBride, W. J., and Bielefeldt-Ohmann, H. (2000): Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* **2**, 1041-50.

Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997): Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9.

Meiklejohn, G., England, B., and Lennette (1952): Propagation of dengue virus strains in unweaned mice. *Am J Trop Med Hyg* **1**, 51-8.

Messer, W. B., Gubler, D. J., Harris, E., Sivananthan, K., and de Silva, A. M. (2003): Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* **9**, 800-9.

Miagostovich, M. P., dos Santos, F. B., Fumian, T. M., Guimaraes, F. R., da Costa, E. V., Tavares, F. N., Coelho, J. O., and Nogueira, R. M. (2006): Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**, 307-13.

Miagostovich, M. P., Ramos, R. G., Nicol, A. F., Nogueira, R. M., Cuzzi-Maya, T., Oliveira, A. V., Marchevsky, R. S., Mesquita, R. P., and Schatzmayr, H. G. (1997): Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol* **16**, 204-8.

Mohan, B., Patwari, A. K., and Anand, V. K. (2000): Hepatic dysfunction in childhood dengue infection. *J Trop Pediatr* **46**, 40-3.

Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. N., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S., Yenichitsomanus, P. T., McMichael, A., Malasit, P., and Screaton, G. (2003): Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* **9**, 921-7.

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., and Rossmann, M. G. (2005): A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* **3**, 13-22.

Nogueira, R. M., Filippis, A. M., Coelho, J. M., Sequeira, P. C., Schatzmayr, H. G., Paiva, F. G., Ramos, A. M., and Miagostovich, M. P. (2002): Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): a case report from Brazil. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **33**, 68-71.

Nogueira, R. M., Schatzmayr, H. G., de Filippis, A. M., dos Santos, F. B., da Cunha, R. V., Coelho, J. O., de Souza, L. J., Guimaraes, F. R., de Araujo, E. S., De Simone, T. S., Baran, M., Teixeira, G., Jr., and Miagostovich, M. P. (2005): Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* **11**, 1376-81.

Paes, M. V., Pinhao, A. T., Barreto, D. F., Costa, S. M., Oliveira, M. P., Nogueira, A. C., Takiya, C. M., Farias-Filho, J. C., Schatzmayr, H. G., Alves, A.

M., and Barth, O. M. (2005): Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology* **338**, 236-46.

Perez, A. B., Garcia, G., Sierra, B., Alvarez, M., Vazquez, S., Cabrera, M. V., Rodriguez, R., Rosario, D., Martinez, E., Denny, T., and Guzman, M. G. (2004): IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol* **73**, 230-4.

Pinto, L. M., Oliveira, S. A., Braga, E. L., Nogueira, R. M., and Kubelka, C. F. (1999): Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94**, 387-94.

Ramos, C., Sanchez, G., Pando, R. H., Baquera, J., Hernandez, D., Mota, J., Ramos, J., Flores, A., and Llausas, E. (1998): Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol* **4**, 465-8.

Raut, C. G., Deolankar, R. P., Kolhapure, R. M., and Goverdhan, M. K. (1996): Susceptibility of laboratory-bred rodents to the experimental infection with dengue virus type 2. *Acta Virol* **40**, 143-6.

Rico-Hesse, R. (1990): Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* **174**, 479-93.

Rico-Hesse, R., Harrison, L. M., Salas, R. A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C., Boshell, J., de Mesa, M. T., Nogueira, R. M., and da Rosa, A. T. (1997): Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* **230**, 244-51.

Sanchez-Burgos, G., Hernandez-Pando, R., Campbell, I. L., Ramos-Castaneda, J., and Ramos, C. (2004): Cytokine production in brain of mice experimentally infected with dengue virus. *Neuroreport* **15**, 37-42.

Schulz, O., Diebold, S. S., Chen, M., Naslund, T. I., Nolte, M. A., Alexopoulou, L., Azuma, Y. T., Flavell, R. A., Liljestrom, P., and Reis e Sousa, C. (2005): Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433**, 887-92.

Schutte, H., Lohmeyer, J., Rosseau, S., Ziegler, S., Siebert, C., Kielisch, H., Pralle, H., Grimminger, F., Morr, H., and Seeger, W. (1996): Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. *Eur Respir J* **9**, 1858-67.

Seth, R. B., Sun, L., and Chen, Z. J. (2006): Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* **16**, 141-7.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* **189**, 1777-82.

Shresta, S., Kyle, J. L., Robert Beatty, P., and Harris, E. (2004): Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology* **319**, 262-73.

Shresta, S., Kyle, J. L., Snider, H. M., Basavapatna, M., Beatty, P. R., and Harris, E. (2004): Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol* **78**, 2701-10.

Shresta, S., Sharar, K. L., Prigozhin, D. M., Beatty, P. R., and Harris, E. (2006): Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol* **80**, 10208-17.

Simmons, J.S. et al. (1931) Experimental studies on Dengue. *Phillippine J Sci* **44**, 189-248.

Solomon, T., and Mallewa, M. (2001): Dengue and other emerging flaviviruses. *J Infect* **42**, 104-15.

Solomon, T., Dung, N. M., Vaughn, D. W., Kneen, R., Thao, L. T., Raengsakulrach, B., Loan, H. T., Day, N. P., Farrar, J., Myint, K. S., Warrell, M. J., James, W. S., Nisalak, A., and White, N. J. (2000): Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* **355**, 1053-9.

Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003): Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335-76.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2007): Signaling pathways activated by microorganisms. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 185-91.

Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001): Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**, 933-40.

Uematsu, S., and Akira, S. (2006): Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* **84**, 712-25.

Vitarana, T., de Silva, H., Withana, N., and Gunasekera, C. (1991): Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med J* **36**, 63-5.

Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E., and Flavell, R. A. (2004): Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* **10**, 1366-73.

Wu, S. J., Grouard-Vogel, G., Sun, W., Mascola, J. R., Brachtel, E., Putvatana, R., Louder, M. K., Filgueira, L., Marovich, M. A., Wong, H. K., Blauvelt, A., Murphy, G. S., Robb, M. L., Innes, B. L., Birx, D. L., Hayes, C. G., and Frankel, S. S. (2000): Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* **6**, 816-20.

Wu, S. J., Hayes, C. G., Dubois, D. R., Windheuser, M. G., Kang, Y. H., Watts, D. M., and Sieckmann, D. G. (1995): Evaluation of the severe combined immunodeficient (SCID) mouse as an animal model for dengue viral infection. *Am J Trop Med Hyg* **52**, 468-76.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003): Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-3.

Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R., Zhang, W., Pletnev, S. V., Sedlak, D., Baker, T. S., Strauss, J. H., Kuhn, R. J., and Rossmann, M. G. (2003): Structures of immature flavivirus particles. *Embo J* **22**, 2604-13.

IX – ANEXOS

- Accept -

To: kroone@icb.ufmg.br,masc.egk@terra.com.br
From: graham.a.dunn@kcl.ac.uk
Date: 10 Jan 2008
CC: journal@rms.org.uk

Subject: Journal of Microscopy - Manuscript JMI-2007-0161.R1

Dear Dr. Erna Kroon

I am pleased to tell you that your Short Communication entitled "Climbing the steps of viral atomic force microscopy: visualization of Dengue virus particles", by 1) Gustavo Ferreira 2) Giliane Trindade 3) José Vilela 4) Maria Silva 5) Margareth Andrade 6) Erna Kroon has been accepted for publication by the Journal of Microscopy.

Please now send to the Editorial Office (address below):

- a hard copy of the final version of the paper, including text and images;
- a CD with electronic versions of the text and images (all as separate files);
- a completed and signed Exclusive Licence Form (available at www.blackwellpublishing.com/pdf/jmi_caf.pdf). Your paper cannot be published until the EL Form has been received.

Please ensure that the text and images comply fully with the Journal's instructions for authors, especially regarding image format and resolution. Detailed instructions regarding artwork are available at www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp.

Please note that Editorial office will not acknowledge receipt of your package, but will contact you if we do not receive the package within one month of this email.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the Editorial Office at journal@rms.org.uk.

With best wishes

Dr. Graham Dunn

Journal of Microscopy
37/38 St Clements
Oxford, OX4 1AJ, UK

