



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

GENÔMICA FUNCIONAL DA NEUROVIRULÊNCIA POR VÍRUS DENGUE
SOROTIPO-1 EM MODELO MURINO

JULIANO BORDIGNON

CURITIBA
MARÇO, 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIANO BORDIGNON

**GENÔMICA FUNCIONAL DA NEUROVIRULÊNCIA POR VÍRUS DENGUE
SOROTIPO-1 EM MODELO MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Claudia N. Duarte dos Santos

CURITIBA

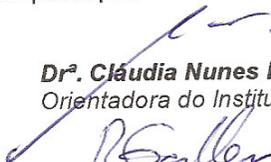
2008

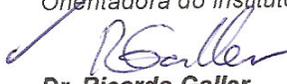
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

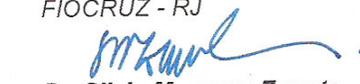
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

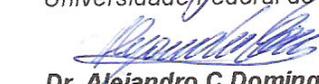
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Dr. Cláudia Nunes Duarte dos Santos
Orientadora do Instituto de Biologia do Paraná - IMBP


Dr. Ricardo Galler
FIOCRUZ - RJ


Dr. Silvio Marques Zanata
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Dr. Carlos R Zanetti
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC


Dr. Alejandro C Dominguez
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

e tendo como suplentes,

Dr. Bruno D. Muniz
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

Dr. Stenio Perdigão Fragoso
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

após argüir o(a) doutorando(a) **Juliano Bordignon** em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "**Genômica funcional da neurovirulência por vírus dengue sorotipo-1 em modelo murino**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, dentro da área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**. A obtenção do título de Doutor está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 14 de março de 2008


Ricardo Fernandez Perez
Coordenador do Curso

A Deus.

Aos meus pais, Danilo Bordignon (In memorium) e Paola Ghermandi Bordignon (In memorium).

A minha esposa, Ana Luiza Pamplona Mosimann.

Ao meu irmão, Fabiano Bordignon.

Aos amigos, Cíntia, Juca e Léa.

Agradecimentos

- A minha orientadora, Dr^a. Claudia Nunes Duarte dos Santos, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, e pelos desafios que me propôs durante a realização desta tese. Gostaria de agradecer ao apoio incondicional ao longo destes anos, pela amizade, orientação e, sobretudo pela confiança em mim depositada.
- Aos diretores do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Drs. Samuel Goldenberg, Stênio P. Fragoso, Marco A. Krieger e Claudia N.D. dos Santos, por criarem um ambiente propício ao desenvolvimento científico e pessoal de seus alunos.
- Ao Dr. Sílvio M. Zanata, pelo auxílio na realização das culturas primárias, pelas valiosas discussões ao longo da tese, e pela amizade.
- Ao Dr. Christian M. Probst, pela realização das análises de bioinformática, discussões e sugestões ao longo destes anos, bem como, pela amizade.
- A Dr^a. Daniela P. Pavoni pela colaboração nos experimentos de microarranjo, e juntamente, com a Dr^a. Celina O. Poerch e a bióloga Andréa Dallabona, pelo auxílio nos experimentos de qPCR.
- A Dr^a. Lúcia de Noronha e a técnica de laboratório Ana Paula C. Martins, pelo auxílio na realização dos experimentos de histologia e imunohistoquímica.
- Aos colegas do lab3, Meri, Ana, Daisy, Vanessa, Suzana, Sônia, Marina, Luana, Eleonora, Mário, Camilla, Giovanny, Guilherme, os quais contribuíram das mais variadas maneiras para a realização desta tese.
- Ao amigo Aurélio Zeferino, pelo valioso auxílio com os experimentos realizados em camundongos.
- Ao biólogo, Paulo R. C. Arauco, pelo auxílio com o uso do seqüenciador automático de DNA.
- Aos colegas do Laboratório de preparo, Nilson J. Fidêncio, Vanessa M. dos Santos e Janaína S. da Silva, que facilitam nosso trabalho com o preparo cuidadoso de reagentes e materiais necessários à realização de nossos experimentos.
- Aos secretários do IBMP, Edilaine Azevedo e Luiz C. Casarotto, e à secretária da Pós-Graduação, Marlene, pelo auxílio nas mais diversas tarefas.

- Ao TECPAR pelo empréstimo do biotério.
- Ao CNPq pela concessão da bolsa.
- A Fundação Araucária, Fundo Paraná, Fiocruz, CNPq pelo apoio financeiro.
- A todos que contribuíram para a realização deste trabalho meus mais sinceros agradecimentos.

Juliano Bordignon

*“Chegará o dia em que os homens conhecerão o
íntimo dos animais, e nesse dia, um crime contra
um animal será um crime contra a humanidade”
Leonardo da Vinci*

*“Decifra-me ou devoro-te”
(mitologia Grega)*

Sumário

	Página
1 Introdução	15
1.1 Aspectos Históricos	15
1.2 A Epidemiologia da Dengue	16
1.3 O Vírus	19
1.4 Tropismo Celular e Replicação Viral	22
1.5 Aspectos Clínicos e Patológicos	25
1.5.1 Apresentações Clínicas não usuais da Dengue	27
1.6 Patogenia da Febre da Dengue (FD) e da Febre Hemorrágica da Dengue (FHD)	29
1.6.1 Teoria dos Anticorpos Potencializadores da Infecção	30
1.6.2 O papel das células T no desenvolvimento da FHD	34
1.6.3 Fatores Virais	36
1.6.4 Variabilidade Genética do Hospedeiro	38
1.7 Estudo da Interação Flavivírus-Hospedeiro	40
2 Justificativa e Objetivos	43
3 Animais e Métodos	45
3.1 Cultura de Células	45
3.2 Cepas virais	46
3.3 Experimentos de neuropatogênese <i>in vivo</i>	47
3.4 Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR)	48
3.5 Caracterização <i>in vitro</i> das cepas virais em culturas primárias	48
3.6 Histopatologia e Imunohistoquímica	49
3.7 Caracterização Molecular da Amostra Neuroadaptada	49
3.8 Mapeamento Tridimensional	51
3.9 Experimentos de Avaliação da Expressão Gênica	51
3.9.1 Análises de bioinformática	54
3.10 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR)	55
4 Resultados	57
4.1 Caracterização Biológica das Cepas Virais	57
4.2 Caracterização Molecular das Cepas Virais	66
4.3 Experimentos de Genômica Funcional e PCR em Tempo Real	68
4.3.1 Análise das vias moduladas durante a infecção do SNC de camundongos com DENV-1 e PCR em tempo real.	79
4.3.2 Análise da expressão gênica diferencial induzida pela cepa neurovirulenta (FGA/NA a5c) versus a cepa parental (FGA/89).	92
5 Discussão	95
5.1 Caracterização Biológica das Cepas Virais	95
5.2 Caracterização Molecular das Cepas Virais	98
5.3 Experimentos de Expressão Gênica	102
5.3.1 Genes Estimulados por Interferon (ISGs)	104
5.3.2 Processamento e Apresentação de Antígenos	107
5.3.3 Sistema Complemento	110
5.3.4 Via de Ubiquitinação	112
5.4 Diferenças na modulação da expressão gênica entre os animais infectados com a cepa parental (FGA/89) e neurovirulenta	

(FGA/NA a5c).	114
5.5 Considerações Finais	117
6 Conclusões	120
7 Perspectivas	122
8 Referências	123
Anexo 1	151
Anexo 2	154
Anexo 3	165

Lista de Figuras

Título da figura	Página
Figura 1.1: Casos de FD, FHD e óbitos no Brasil entre 1986-2007.	18
Figura 1.2: Representações esquemáticas da estrutura da partícula do vírus da dengue.	20
Figura 1.3: Organização estrutural e funcional do genoma do vírus da dengue.	23
Figura 1.4: Representação esquemática da replicação do vírus da dengue.	25
Figura 1.5: Apresentações clínicas da infecção pelo vírus da dengue.	26
Figura 1.6: Representação esquemática do fenômeno dos anticorpos potencializadores da infecção.	31
Figura 1.7: Representação esquemática do modelo de imunopatogenia da dengue.	34
Figura 1.8: Representação esquemática do modelo do pecado original de linfócitos T	36
Figura 3.1: Representação esquemática das hibridações das amostras nos microarranjos.	53
Figura 4.1: Mortalidade, carga e progênie viral no SNC dos animais infectados com as diferentes cepas virais.	58
Figura 4.2: Imunofluorescência de células NP infectadas com as diferentes cepas virais.	59
Figura 4.3: Imunofluorescência de células MPC infectadas com as diferentes cepas virais.	60
Figura 4.4: Imunofluorescência de células C6 (glioma de ratos) infectadas com as diferentes cepas virais.	61
Figura 4.5: Imunofluorescência de células N2A infectadas com as diferentes cepas virais.	62
Figura 4.6: Análises histológicas do SNC de camundongos suíços infectados com as diferentes cepas de DENV-1.	63
Figura 4.7: Análises de imunohistoquímica do córtex neuronal de camundongos infectados com as diferentes cepas virais com 10 dpi.	64
Figura 4.8: Análises de imunohistoquímica do hipocampo de camundongos infectados com as diferentes cepas virais com 10 dpi.	65
Figura 4.9: Representação esquemática do domínio helicase da proteína NS3 do vírus dengue sorotipo 2.	68
Figura 4.10: Diferença nos níveis de RNA viral no SNC de camundongos infectados com as cepas parental (FGA/89), neurovirulenta (FGA/NA a5c) e <i>mock</i> (controle negativo) nos dias 5, 6, 7 e 8 dpi.	70
Figura 4.11: Imagem obtida após a hibridação das amostras <i>mock</i> 8 dpi (Cy5) e FGA/89 8 dpi (Cy3), lâmina 8 da figura 3.1.	70
Figura 4.12: Principais vias moduladas durante a infecção do SNC murino por DENV-1 obtida pelo software <i>Ingenuity® Systems</i> .	80
Figura 4.13: Representação dos genes modulados na via de sinalização por IFN.	81
Figura 4.14: Quantificação da modulação dos genes da via de sinalização por IFN, utilizando PCR em tempo real.	82
Figura 4.15: Quantificação da modulação de ISGs, utilizando PCR em	83

tempo real.	
Figura 4.16: Representação dos genes modulados na via de apresentação de antígenos.	84
Figura 4.17: Quantificação da modulação dos genes envolvidos no processamento e transporte de antígenos para o RER, por qPCR.	85
Figura 4.18: Quantificação da modulação dos genes de MHC classe I e II por qPCR.	86
Figura 4.19: Representação dos genes modulados na via de ativação do complemento.	87
Figura 4.20: Quantificação da modulação dos genes da via de ativação do complemento.	88
Figura 4.21: Quantificação da modulação dos genes da via tipo-ubiquitina por PCR em tempo real.	89
Figura 4.22: Quantificação da modulação dos genes IFN- α/β .	90
Figura 4.23: Comparação da modulação da expressão gênica obtida pelas técnicas de microarranjo e qPCR.	91
Figura 4.24: Quantificação da modulação dos genes de quimiocinas do tipo C-C e C-X-C no SNC murino.	93
Figura 5.1: Representação esquemática do mecanismo de sinalização da via de IFN tipo I.	103
Figura 5.2: Hipótese proposta para explicar a neurovirulência pelo vírus dengue sorotipo 1.	118
Figura A2.1: Progênie viral no sobrenadante de culturas de células NP e MPC infectadas com as diferentes cepas virais.	155
Figura A2.2: Quantificação do RNA viral em células NP e MPC infectadas com as diferentes cepas virais por qPCR.	156
Figura A2.3: Representação dos genes modulados na via tipo-ubiquitina.	157
Figura A2.4: Quantificação da modulação dos genes <i>Icam1</i> , <i>Cd274</i> e <i>Serpina3g</i> no SNC de camundongos suíços infectados com as cepas: FGA/89, FGA/NA a5c e mock nos dias 5, 6, 7 e 8 dpi.	158
Figura A2.5: Modulação da expressão dos genes <i>Clec4a3</i> , <i>Serpin3f</i> , <i>9530028C05</i> , <i>Cxcl11</i> , <i>Tgtp</i> , <i>Cxcl13</i> , <i>Tlr3</i> , <i>H2-D1</i> , <i>Gzma</i> , <i>Xdh</i> , <i>Ch25h</i> , <i>Sell</i> e <i>Slnf4</i> por microarranjo (valores em Log ₂).	159-60
Figura A2.6: Modulação da expressão dos genes <i>Ccl4</i> e <i>Cxcl9</i> por microarranjo (valores em Log ₂).	160
Figura A2.7: Comparação da modulação da expressão gênica obtida pelas técnicas de microarranjo e qPCR	161-64

Lista de Tabelas

Título da tabela	Página
Tabela 3.1: Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para a amplificação de genes murinos, modulados durante a infecção por DENV-1 no SNC.	56
Tabela 4.1: Mutações aminoacídicas entre os vírus neuroadaptados FGA/NA a5c e FGA/NA d1d comparados com a cepa parental FGA/89.	67
Tabela 4.2: Genes superexpressos no SNC de camundongos infectados com as cepas FGA/89, FGA/NA a5c e <i>mock</i> nos dias 5, 6, 7 e 8 pós-infecção (dpi).	72
Tabela 4.3: Genes modulados na infecção com a cepa FGA/NA a5c em comparação com a cepa FGA/89.	94

Lista de Abreviaturas

ADE: *antibody dependent enhancement*/anticorpos potencializadores da infecção
AP-1: proteína ativadora 1
AP61: células de *Aedes pseudocutellaris*
aRNA: ácido ribonucléico amplificado
Asn: asparagina
Asp: aspartato
C: capsídeo
C6: células de glioma de ratos
C636: células de glândula salivar de *Aedes albopictus*
cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar
CO₂: gás carbônico ou dióxido de carbono
CR: complexo de replicação
dATP: adenina deoxinucleotídeo trifosfato
DC: célula dendrítica
dCTP: citosina deoxinucleotídeo trifosfato
DENV: vírus da dengue
DEPC: dietilpirocarbonato
dGTP: guanina deoxinucleotídeo trifosfato
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: deoxinucleotídeo
dTTP: timina deoxinucleotídeo trifosfato
E.U.A./USA: Estados Unidos da América
E: envelope
Eif2ak2: fator de iniciação de tradução eucariótica 2-alfa quinase 2
FD: febre de dengue
FDR: *false discovery rate*
ffu_{C636}: unidades formadoras de foco em células C636
FHD: febre hemorrágica de dengue
g: grama
Gapdh: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Glu: glutamato
GM-CSF: fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos
h: hora(s)
HCV: vírus da hepatite C
HepG2: células de hepatoma humano
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HLA: *human leukocyte antigen*/antígeno leucocitário humano
Hsp: proteínas de choque térmico
HSV: vírus herpes simplex
HUVEC: células endoteliais de cordão umbilical humano
ICAM-3: *intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*
IFN: interferon
IKK ϵ : quinase-epsilon I κ B
IL: interleucina
Ile: isoleucina
IPS-1: estimulador do promotor de IFN- β 1
Irf: fator regulador de interferon
ISG: gene estimulado por interferon

Isgf: fator de transcrição dependente de interferon
JAK: quinase do tipo Janus
LCMV: vírus da coriomeningite linfocitária
Leu: leucina
Lys; lisina
M: membrana
MDA-5: gene associado a diferenciação do melanoma 5
MEEBO: *mouse exonic evidence-based oligonucleotide*
Met: metionina
mg: miligrama
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
MHV: vírus da hepatite murina
min.: minuto(s)
mJ: milijoule
mL: mililitro
mM: milimolar
MOI: multiplicidade de infecção
MPC: macrófagos peritoniais de camundogo
mRNA: ácido ribonucléico mensageiro
Mx: proteína de resistência a mixovírus
N: normal
N2A: células de neuroblastoma murino
NaOH: hidróxido de sódio
NF- κ B: fator nuclear κ B
ng: nanograma
NGC: *New Guinea C*
nm: nanômetro
nmol: nanomol
NP: neurônio primário
NS: não-estrutural
NTPase: nucleosídeo 5'-trifosfatase
OAS: 2'-5'oligoadenilato sintetase
p: significância
PAMPs; padrões moleculares associados à patógenos
PBMC: células polimorfonucleares
PBS: salina fosfatada tamponada
PCR: reação em cadeia da polimerase
PEG: polietilenoglicol
Phe: fenilalanina
PKR: proteína quinase R
PMT: fotomultiplicador
PrKR: proteína quinase dependente de dupla-fita de RNA
prM: precursora de membrana
Pro: prolina
PRR: receptores de reconhecimento de padrão
qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa ou reação em cadeia da polimerase em tempo real
qRT-PCR: transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa
RdRP: RNA polimerase dependente de RNA

RE: retículo endoplasmático
RER: retículo endoplasmático rugoso
RIG-1: gene induzível por ácido retinóico 1
RME: endocitose mediada por receptor
RNA: ácido ribonucleico
RTPase: RNA 5'-trifosfatase
RT-PCR: transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase
SC: sistema complemento
SCD: síndrome do choque de dengue
SDS: dodecil sulfato de sódio
seg.: segundo(s)
Ser: serina
SNC: sistema nervoso central
SSC: tampão de citrato de sódio
Stat: *signal transducer and activator of transcription*
TAP: proteínas transportadoras associadas a antígeno
TBE: encefalite transmitida por carrapatos
TBK-1: quinase ligadora de TANK 1
TGF: fator de crescimento transformante
TGN: rede trans-golgi
Thr: treonina
TIFF: *tag image file format*
TLR: receptor do tipo *Toll*
TNF: fator de necrose tumoral
U: unidades
UI: unidades internacionais
Usp-18: protease ubiquitina específica 18
Val: valina
VEEV: vírus da encefalite eqüina venezuelana
VSV: vírus da estomatite vesicular (VSV)
WNV: vírus do oeste do Nilo
 μ L: microlitro
 μ M: micromolar

Resumo

O vírus da dengue (DENV) causa uma doença febril, conhecida com febre da dengue (FD), que pode evoluir para um quadro hemorrágico seguido ou não de choque, conhecidos como, febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque da dengue (SCD). Recentemente, o perfil clínico da infecção pelo DENV vem mudando, e manifestações neurológicas têm se tornado freqüentes. Objetivando determinar o papel de fatores virais e do hospedeiro na patogênese da neurovirulência pelo DENV, nós caracterizamos as cepas FGA/89 (parental) e FGA/NA a5c (neurovirulenta), a nível biológico e molecular. Adicionalmente, nós estudamos a resposta do tecido nervoso, através da avaliação da modulação da expressão gênica em camundongos suíços infectados com ambas as cepas. Foi demonstrado que a cepa FGA/NA a5c apresenta duas mutações na proteína E (Met₁₉₆/Val e Thr₂₇₆/Pro), e uma na porção helicase da NS3 (Leu₄₃₅/Ser). Estas mutações podem estar implicadas na aquisição do fenótipo de neurovirulência em modelo murino. Foi ainda demonstrado que os animais infectados com a cepa FGA/NA a5c desenvolvem sinais de encefalite por volta do 10° dia pós-infecção (dpi), e evoluem para óbito com sinais de encefalite com 13,1 dpi \pm 2,2, ao contrário dos animais infectados com a cepa FGA/89, BR-01/MR (controle) e *mock*. Adicionalmente, a cepa FGA/NA a5c apresentou maior replicação viral e produção de partículas virais infectivas no SNC murino no 9° dpi, quando comparado à cepa parental (3,7 e 19,2 vezes, respectivamente,). No entanto, *in vitro*, não foi possível detectar diferenças na replicação viral e produção de partículas virais infectantes em culturas primárias de neurônios e macrófagos peritoniais de camundongos infectados com as cepas FGA/89, FGA/NA a5c e BR-01/MR. Visando conhecer a resposta do hospedeiro a infecção, camundongos suíços foram infectados com 8.000 ffu_{C636} das cepas, FGA/89 e FGA/NA a5c, e o perfil de modulação da expressão gênica nos dias 5, 6, 7 e 8 dpi, foram analisados utilizando o *VCU Mus musculus biochip* (Virginia Commonwealth University, USA). As análises de bioinformática revelaram a modulação na expressão de 148 genes no SNC murino infectado com ambas as cepas, FGA/89 e FGA/NA a5c com relação ao *mock*. Análises com o software *Ingenuity Pathways Systems* (IPA) demonstraram que as principais vias moduladas no SNC murino infectado são: via de sinalização por IFN, processamento e apresentação de antígenos, ativação do complemento e via tipo-ubiquitinação. Adicionalmente, análises *in silico* permitiram selecionar 15 genes como modulados diferencialmente na infecção com a cepa neuroadaptada FGA/NA a5c, comparada a parental FGA/89. Dentre estes, chama a atenção a expressão diferencial de 4 genes que codificam para quimiocinas quimioatrativas. Além disso, a quantificação da modulação da expressão gênica por qPCR corroborou os dados de microarranjo. Atualmente, esta sendo realizada a caracterização biológica das vias em questão, objetivando definir a sua importância na patogenia da encefalite por DENV-1 em modelo murino.

Abstract

Dengue virus (DENV) causes a self-limiting fever (DF) or severe hemorrhagic fever/shock-syndrome (DHF/DSS). Recently, clinical profile of DENV infection is changing, and neurological manifestations are becoming frequent. Aiming determine the viral factors responsible for neurovirulent phenotype in mice, we perform biological and molecular characterization of FGA/89 (parental) and FGA/NA a5c (neurovirulent). We demonstrated that mutations on E (Met₁₉₆/Val and Thr₂₇₆/Pro) and NS3 (Leu₄₃₅/Ser) proteins may account for DENV neurovirulence for mice. Additionally, animals infected with FGA/NA a5c show higher viral replication and production of viable viral particles at 9 days post-infection (dpi) than animals infected with FGA/89 (3.7 and 19.2 x, respectively). Animals infected with FGA/NA a5c show clinical signs of encephalitis around 10 dpi and succumb to death (13.1 dpi \pm 2.2), in contrast with animals infected with FGA/89, BR-01/MR (control) and mock. However, we are not able to detect differences in viral replication and production of viable viral particles in primary cultures of neuron and peritoneal macrophages, infected with FGA/89, FGA/NA a5c and BR-01/MR. Aiming to determine host response to infection with neurovirulent (FGA/NA a5c) and parental (FGA/89) strains of DENV-1, we use *VCU Mus musculus biochip* (Virginia Commonwealth University, USA) encompassing whole mouse genome. Newborn Swiss mice were infected intracerebrally with 8.000ff_{UC636} of FGA/89, FGA/NA a5c and *mock*. Microarray analyzes were carried out at 5, 6, 7 and 8 dpi in central nervous system (CNS) of *mock*, FGA/89 and FGA/NA a5c infected animals. Bioinformatic analysis reveals 148 genes up-regulated in CNS infection by DENV-1, at higher levels in animals infected with FGA/NA a5c. Analysis with software *Ingenuity Pathways Systems* (IPA) shows that the main pathways modulated by DENV infection in the mouse CNS are IFN signaling, antigen presentation, complement cascades and protein ubiquitination. Additionally, by *in silico* analyses, we selected 15 genes, among those 4 are of special interest and are genes of chemokines with chemoattractant activity, that are up-regulated by infection with neurovirulent virus against parental. Actually we are performing biological characterization of selected genes and pathways.

1. Introdução

1.1 Aspectos Históricos

Os primeiros registros de uma doença semelhante à dengue estão descritos na Enciclopédia Chinesa de sintomas e remédios, e datam da Dinastia Chin (265-420 a.C.). A doença era conhecida como “água envenenada” pelos Chineses, e acreditava-se que estivesse relacionada com insetos voadores associados à água. Ao longo do tempo, a dengue recebeu os mais variados nomes, conforme o país ou a região considerada, como “febre da China” na Ásia, “*bohou*” na Oceania, “febre quebra-ossos” nos Estados Unidos, “colorado” em colônias espanholas, “*dandy fever*” em colônias inglesas, “dengue” nas Antilhas, “polca” no Rio de Janeiro e “patuléia” na Bahia (GUBLER, 1998).

As duas primeiras descrições da doença na literatura médica foram feitas no século XVIII. Em 1779, durante uma epidemia caracterizada por uma doença febril em Batavia, David Bylon fez a primeira descrição clínica da dengue, e a denominou “*Knokkel-koorts*”, nós dos dedos ou febre das juntas (CAREY, 1971). Uma descrição mais detalhada da dengue foi realizada pelo Dr. Benjamin Rush após observar vários pacientes durante uma epidemia em 1780 na Filadélfia, Pensilvânia (RUSH, 1789). A epidemia ficou conhecida como “Febre quebra-ossos” (“*Break-bone fever*”).

A transmissão da dengue por mosquitos do gênero *Aedes* foi primeiramente descrita por Bancroft em 1906, e posteriormente provada por Siler e colaboradores (1926). Ashburn e Craig encontraram um agente filtrável no sangue humano em 1906, e Simmons e colaboradores transmitiram o vírus para voluntários humanos e definiram o período de incubação em mosquitos, em 1926 e 1931, respectivamente (SIMMONS, 1931).

Durante a 2ª Guerra Mundial, Hotta, Kimura, Sabin e Schlesinger isolaram os vírus tipo 1 e 2, identificando a presença da imunidade homotípica de infecções sucessivas e descrevendo a importância clínica e diagnóstica dos anticorpos neutralizantes (HOTTA, 1952; SABIN, 1952). Em 1956, ocorreu uma epidemia de dengue em Manila, nas Filipinas, resultando na identificação dos vírus 3 e 4 (HAMMON, 1960).

A febre hemorrágica da dengue (FHD) foi diagnosticada na década de 50, associada com a Febre Hemorrágica das Filipinas e a Febre Hemorrágica da Tailândia (HALSTEAD, 1963). Alguns casos esporádicos de FHD foram relatados nas Américas nas décadas de 60 e 70, mas foi a epidemia de Cuba em 1981 que marcou o início da FHD nas Américas (KOURI, 1989).

Nos anos seguintes à II Guerra Mundial a dengue foi se espalhando lentamente, sendo que o número de países e pessoas infectadas vem aumentando regularmente, constituindo-se atualmente em um grave problema de saúde pública.

1.2 A Epidemiologia da Dengue

A dengue é a principal arbovirose tropical transmitida ao homem através da picada de mosquitos hematófagos fêmeas do gênero *Aedes* (HENCHAL & PUTNAK, 1990). A dengue está distribuída em todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta, e constitui atualmente um sério problema de saúde pública, em especial, no sudeste da Ásia e nas Américas do Sul e Central (GUZMÁN & KOURI, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002) estima que 50-100 milhões de pessoas se infectem anualmente em 100 países, de todos os continentes, com exceção da Europa. Destes casos, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e pelo menos 20 mil morrem. No momento ainda não existe uma vacina contra a dengue e seu desenvolvimento esbarra em várias limitações, como a necessidade de ser uma vacina tetravalente, a falta de um modelo animal capaz de refletir as diferentes formas clínicas da doença, o dogma da infecção potencializada pelos anticorpos heterólogos, ocorrência de recombinação intra-genotípica e do fenômeno de interferência viral (HOLMES et al., 1999).

A emergência global da dengue está diretamente ligada à carência de um programa eficiente de combate ao mosquito transmissor em áreas onde a dengue é endêmica. Atualmente, são utilizados inseticidas sob a forma de *spray*, os quais não têm se mostrado eficazes, pois as taxas de infestação pelo *Aedes aegypti* vêm aumentando, principalmente nas áreas urbanas (THOMAS et al., 2003; GUZMÁN & KOURI, 2003). Outro fator responsável pela manutenção da epidemia de dengue é o aumento do número de viagens aéreas, possibilitando o transporte de indivíduos

infectados entre diversas partes do mundo. Muitos dos visitantes contraem o vírus em países tropicais, apresentando sinais clínicos da dengue apenas quando retornam ao seu país de origem, permitindo o rápido deslocamento dos vírus e muitas vezes a introdução de novos sorotipos e/ou genótipos. Outro ponto importante são as profundas mudanças sociais e demográficas vividas nas últimas décadas, como a urbanização crescente e desorganizada e o grande aumento populacional, que acabaram por criar condições que sustentam a transmissão de doenças transmitidas por mosquitos vetores (GUBLER, 1998).

Recentemente, um aspecto que chama a atenção é o impacto que as alterações climáticas podem desempenhar nas doenças tropicais. O aumento da temperatura pode levar a uma migração da dengue de regiões tropicais para as regiões temperadas do globo. O aumento da temperatura cria condições favoráveis ao mosquito transmissor (*A. aegypti*) da dengue para migrar para áreas temperadas, uma vez que o mosquito não sobrevive em baixas temperaturas. A replicação viral no mosquito leva de uma a duas semanas até que o vírus atinja a glândula salivar do mosquito e alcance títulos suficientemente altos para ser transmitido. Este período de incubação no mosquito é reduzido caso a temperatura ambiente seja mais elevada. Adicionalmente, os mosquitos se desenvolvem mais rapidamente em temperaturas elevadas quando comparado às temperaturas mais baixas. Deste modo, o potencial de transmissão da dengue em um cenário de aquecimento global, é de aumento das áreas endêmicas para dengue, bem como, de maior número de surtos epidêmicos (SHOPE, 1992).

No Brasil, a dengue tem sido objeto de uma das maiores campanhas de saúde pública realizadas nos últimos anos. O mosquito transmissor da doença, o *Aedes aegypti*, que havia sido erradicado de vários países do continente Americano nas décadas de 50 e 60, retornou na década de 70, devido às falhas na vigilância epidemiológica e pelas rápidas mudanças sociais e ambientais desencadeadas pela urbanização acelerada (GUZMÁN & KOURI, 2003). No Brasil o mosquito voltou a ser detectado em 1975, no estado da Bahia, e em 1977 no Rio de Janeiro (SCHATZMAYR, 2000). Em abril de 1986 o vírus da dengue sorotipo-1 foi isolado, inicialmente no estado do Rio de Janeiro, causando uma grande epidemia de dengue, após mais de 60 anos sem notificação da doença (SCHATZMAYR, 1986). Quatro anos mais tarde, em 1990, o vírus da dengue sorotipo-2, foi detectado, novamente no estado do Rio de Janeiro, causando um claro aumento no número de

casos graves da doença (SCHATZMAYR, 2000). Finalmente, no ano de 2000, a introdução do sorotipo-3 e sua co-circulação com os sorotipos 1 e 2, levou a uma grande epidemia de dengue em 2002, com 780.644 casos de FD, 2.607 casos de FHD e 145 óbitos (NOGUEIRA, 2001; PAHO, 2007; Figura 1.1).

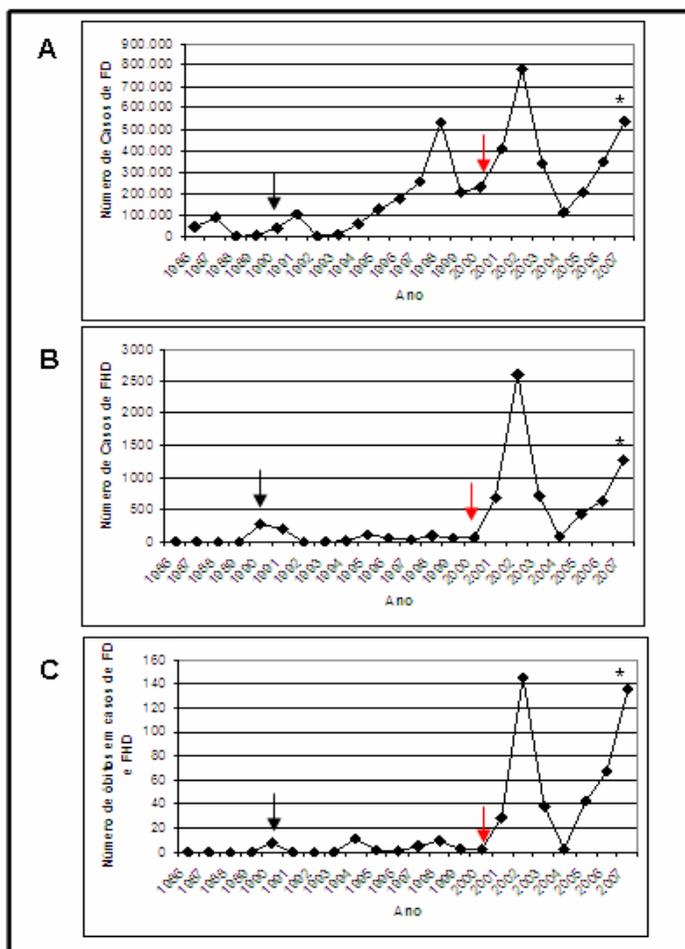


Figura 1.1: Casos de FD, FHD e óbitos no Brasil entre 1986-2007. Número de casos de FD (A), FH (B) e óbitos (C) por dengue no Brasil entre 1986 e 2007. A seta preta indica o ano de 1990, no qual ocorreu a introdução do sorotipo DENV-2. A seta vermelha indica a introdução do sorotipo DENV-3 no ano de 2000. *Dados parciais de janeiro a novembro de 2007. Fonte: Ministério da Saúde (www.saude.gov.br; Ministério da Saúde, 2007) e Organização Pan-Americana de Saúde (www.paho.org; PAHO, 2007).

Um balanço parcial dos casos de dengue no ano de 2007 entre janeiro e novembro, mostra um total de 536.519 casos, com 1.275 casos de FHD e 136 óbitos, um aumento de quase 200 mil casos em relação a 2006. Dois aspectos chamam a atenção nos novos dados, o primeiro são os primeiros casos autóctones detectados no estado do Rio Grande do Sul, deste modo, apenas Santa Catarina

não apresenta transmissão autóctone do vírus. O segundo ponto é o aumento da letalidade da FHD, que passou de 5,5% na epidemia de 2002 para 10,7% no último ano. O monitoramento da circulação viral demonstra ainda o predomínio do sorotipo DENV-3, com 79% dos casos. No entanto, a circulação do sorotipo DENV-2 também se mantém importante, com 18% dos casos, concentrados especialmente nos estados de Alagoas, Ceará, Maranhão, Piauí, Amapá e Roraima. Cabe salientar que apesar de baixa (3%) a circulação do sorotipo DENV-1 ainda ocorre em nosso país. Deste modo, atualmente os sorotipos DENV-1, 2 e 3 co-circulam no Brasil (Ministério da Saúde, 2007).

1.3 O Vírus

O vírus da dengue (DV) pertence à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, podendo ser classificado em quatro sorotipos distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e a infecção por qualquer um dos quatro sorotipos causa manifestações clínicas similares (CALISHER et al., 1989). O vírion é uma partícula esférica, com diâmetro entre 40 e 60 nm, envolta por um envelope lipídico derivado da célula do hospedeiro, cujo genoma é formado por uma molécula de RNA fita simples com polaridade positiva, sendo, portanto, infeccioso (Figura 1.2). O RNA viral é composto por aproximadamente 11.000 nucleotídeos, e possui uma única fase aberta de leitura que codifica uma poliproteína, que é clivada co- e pós-traducionalmente por proteases virais e da célula hospedeira, para gerar o conjunto das 3 proteínas estruturais e das 7 não-estruturais. As proteínas estruturais codificadas pelo genoma são as de capsídeo (C), precursora da proteína de membrana (prM/M) e de envelope (E), além de sete proteínas não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (CHAMBERS et al., 1990). O limitado tamanho do genoma viral faz com que suas proteínas sirvam para múltiplas funções durante a replicação viral (Figura 1.3).

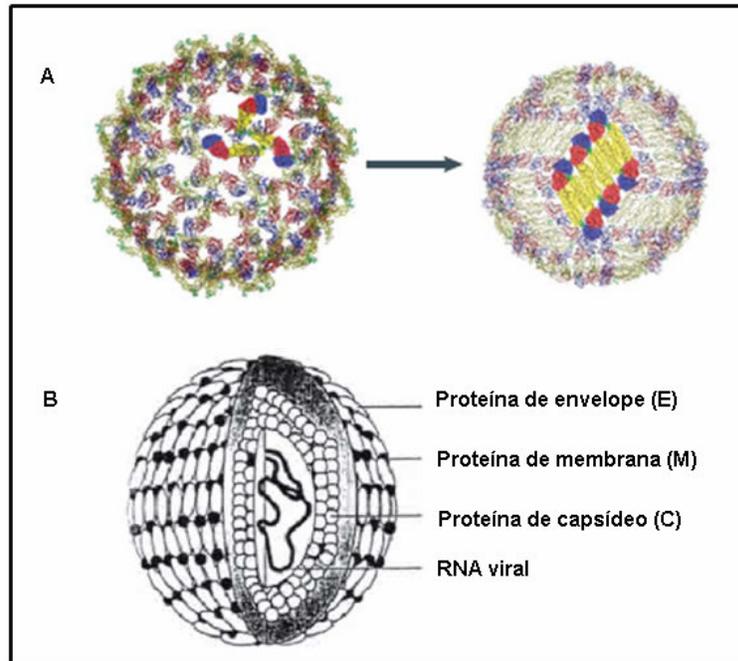


Figura 1.2: Representações esquemáticas da estrutura da partícula do vírus da dengue. Em A pode ser observada a transição da partícula do vírus da dengue de sua forma imatura (esquerda) para a forma madura (direita) antes de sua liberação das células infectadas. Em B a representação esquemática da partícula do vírus da dengue, mostrando o empacotamento interno do RNA viral dentro do nucleocapsídeo viral. FONTE: MUKHOPADHYAY, KUHN, ROSSMANN, (2005) e modificado de CABEZAS et al., (2005).

A proteína do capsídeo viral (C) é a responsável por conferir a forma esférica à partícula viral, possui um peso molecular de 11kDa e caráter básico. A proteína precursora de membrana (prM) é glicosilada, tem 26kDa e é clivada durante a replicação viral por uma protease do tipo furina, gerando a proteína estrutural M de 8kDa, que juntamente com a proteína de envelope (E), forma o revestimento externo da partícula viral (CHAMBERS et al., 1990). A proteína M auxilia na exposição do domínio de ligação ao receptor da proteína de envelope (E) (HEINZ & ALLISON, 2003), protege a proteína E da reorganização estrutural e da fusão prematura durante a secreção (ZHANG et al., 2003; HEINZ & ALLISON, 2003).

A proteína de envelope representa o principal componente antigênico do vírus, sendo a única capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes da infecção *in vivo* (HE et al., 1995). Além disso, pode agir como hemaglutinina viral, apresentar capacidade fusogênica com membranas da célula hospedeira, bem como, interagir com seus receptores, afetando desta forma, o tropismo celular e a penetração do vírus no citoplasma das células hospedeiras (GOLLINS & PORTERFIELD, 1986; REY et al., 1995; MODIS, 2004). Possui três domínios: o

primeiro (I) central, o segundo (II) que contém a região de dimerização e o peptídeo de fusão e o terceiro (III), o qual apresenta o sítio de ligação ao receptor. A proteína E existe como um homodímero na partícula viral madura (MODIS et al., 2004), quando em ambiente ácido, como no endossomo tardio, ocorre a trimerização irreversível da proteína E, resultando na sua fusão com a membrana do endossomo (MUKHOPADHYAY, KUHN e ROSSMANN, 2005).

A glicoproteína não-estrutural 1 (NS1), com 45kDa, pode ser detectada nas formas intracelular ou associada à superfície das células de vertebrados, ou ainda, no meio extracelular sob forma hexamérica (WINKLER et al., 1988 e 1989; FLAMAND, et al., 1999). A proteína NS1, assim como as demais proteínas não-estruturais (NS) estão envolvidas na formação do complexo de replicação viral, porém, não se conhece exatamente sua função (KHROMYKH, SEDLAK e WESTAWAY, 1999a; KHROMYKH et al., 1999b; MACKENZIE et al., 1998; MACKENZIE, JONES e WESTAWAY, 1999). A secreção desta proteína no meio extracelular induz uma forte produção de anticorpos específicos (não-neutralizantes), que são importantes em termos de diagnóstico, além de “desviarem a atenção” do sistema imunológico do hospedeiro, o que podem ter relevância na patogênese da infecção (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006; DUSSART et al., 2006).

Uma das proteínas mais importantes no complexo de replicação viral, é a NS3 (68kDa), que apresenta as funções de protease, helicase, nucleosídeo 5'-trifosfatase (NTPase) e RNA 5'-trifosfatase (RTPase), fundamentais na replicação viral e na reação de *capping* do RNA viral (BENARROCH et al., 2004). Os 180 primeiros aminoácidos na região amino terminal, associados à proteína NS2B (co-fator), apresentam atividade serina-protease, catalisando as clivagens de várias das proteínas virais durante a replicação (CHEN et al., 1997; CUI et al., 1998; KHROMYKH, SEDLAK e WESTAWAY et al., 1999a; KHROMYKH et al., 1999b; LINDENBACH & RICE, 2003). A região carboxi-terminal da proteína (a partir do aminoácido 181) apresenta atividade de helicase (replicação viral) e RNA 5'-trifosfatase, envolvida na formação do *capping* na extremidade 5' do genoma (WENGLER & WENGLER, 1991; KHROMYKH, SEDLAK e WESTAWAY, 1999a; KHROMYKH et al., 1999b; LINDENBACH & RICE, 2003).

A maior das proteínas NS, a NS5, com aproximadamente 100kDa, possui uma das seqüências mais conservadas entre os flavivírus, apresentando caráter básico e motivos que indicam atividade de RNA polimerase dependente de RNA

(RdRP, replicase viral) (KAMER & ARGOS, 1984; CHAMBERS 1990), além de atividade de metiltransferase (KOONIN, 1993; LINDENBACH & RICE, 2003). Recentemente, foi demonstrado que durante a replicação viral, a proteína NS5 migra para o núcleo das células e induz a transcrição e tradução da interleucina 8 (IL-8), um importante mediador na patogenia da infecção (MEDIN, FITZGERALD & ROTHMAN, 2005).

As funções das proteínas NS2A, NS4A e NS4B não são ainda muito bem caracterizadas. São pequenas proteínas hidrófóbicas, que parecem auxiliar na localização do RNA viral durante a sua síntese (BURKE & MONATH, 2001). Recentemente, foi demonstrado que a NS4B, e com menor importância a NS2A e NS4A, são capazes de bloquear a via de interferon (IFN; MUNOZ-JORDAN et al., 2003 e 2005). No entanto, a NS4B sozinha mostrou-se um forte inibidor da via de sinalização de IFN- β e IFN- γ .

1.4 Tropismo Celular e Replicação Viral

A primeira etapa na replicação viral consiste na ligação e infecção de uma célula susceptível pelo vírus. *In vitro*, foi demonstrado que o vírus da dengue é capaz de infectar vários tipos de células humanas, como células dendríticas (DCs), monócitos/macrófagos, células B e T, células endoteliais, hepatócitos e células neuronais, além de uma numerosa quantidade de linhagens celulares utilizadas para propagação viral (ANDERSON, 2003). As primeiras células alvo da infecção em humanos são as da linhagem fagocítica mononuclear (monócitos, macrófagos e DCs). Além destas células, as células de Langerhans da pele (DCs da pele residentes) foram também caracterizadas como um dos primeiros sítios de replicação viral no homem, conforme demonstrado após a inoculação de vacina atenuada (WU et al., 2000).

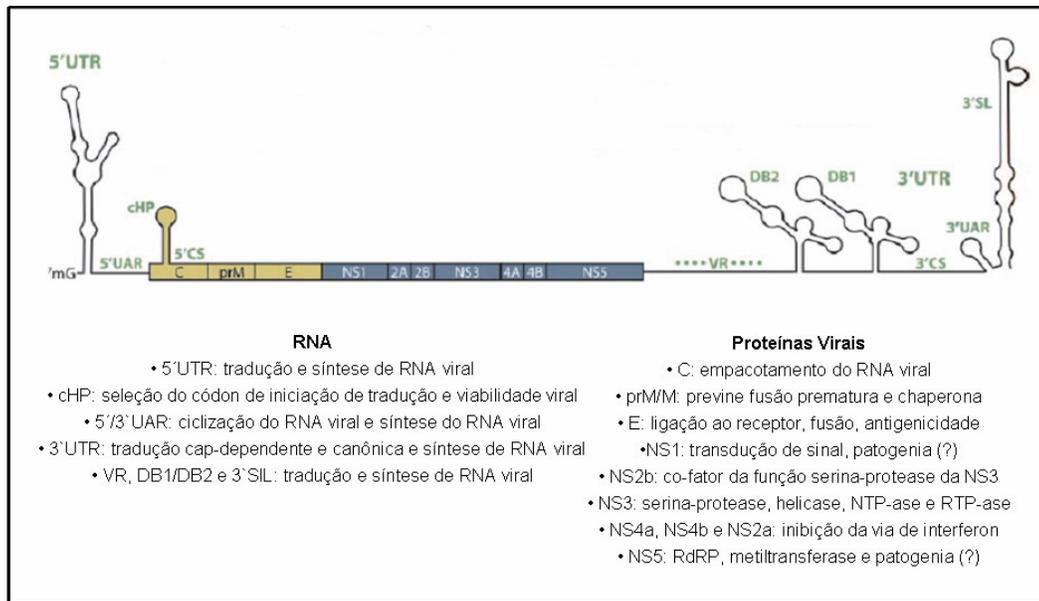


Figura 1.3: Organização estrutural e funcional do genoma do vírus da dengue. Estrutura do genoma do vírus da dengue evidenciando-se as principais estruturas do RNA viral (com suas funções principais) e as proteínas virais e suas funções. O RNA viral contém uma estrutura tipo cap na sua extremidade 5', e uma única fase de leitura. A estrutura secundária é baseada em uma cepa de vírus dengue tipo-2 do sudoeste Asiático, e é similar para diferentes cepas e sorotipos. As estruturas designadas como cHP, CS, UAR, DB1, DB2 e 3'SL foram compiladas de uma combinação de predições computacionais, análises funcionais e da predição de estruturas. RdRP: RNA-polimerase RNA-dependente e DB: *dumbell*. FONTE: Modificado de CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006.

Um dos pontos chave na determinação do tropismo celular está na determinação dos receptores celulares que o vírus utiliza para infectar a célula do hospedeiro. Muitos trabalhos têm sido realizados nos últimos anos na tentativa de se caracterizar o receptor que o vírus da dengue utiliza para infectar células hospedeiras. Vários receptores celulares diferentes foram descritos em células de mamíferos, como o heparan sulfato (CHEN et al., 1997), as proteínas de choque térmico 70 (Hsp70) e 90 (Hsp90) (VALLE et al., 2005), entre outras. No entanto, um dos receptores melhor caracterizado até o momento é a molécula ICAM-3 (do inglês, *Intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*), também conhecida com CD209 ou DC-SIGN (LOZACH et al., 2005). DC-SIGN é capaz de proporcionar a infecção com os quatro sorotipos do vírus da dengue e a sua expressão ectópica confere permissividade à infecção em linhagens celulares normalmente não permissivas (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003; TASSANEETRITHEP et al., 2003).

Adicionalmente ao tipo celular, trabalhos recentes têm demonstrado que o momento do ciclo celular pode ser um fator importante na determinação do tropismo

celular. Células de hepatoma humano (HepG2) retidas na fase G₂ são mais permissivas à infecção produzindo maiores títulos virais, quando infectadas com o sorotipo 2 e 3 (PHOOLCHAROEN & SMITH, 2004). Foi demonstrado que a maior entrada de partículas virais na célula é o mecanismo responsável pela produção de um maior título. Adicionalmente, foi demonstrado que a entrada de partículas virais é mais eficiente (título viral 30 vezes maior) em células de glândula salivar de *Aedes albopictus* (C636) retidas na fase S, comparado com a infecção de células C636 não-sincronizadas (HELT & HARRIS, 2005).

Após a ligação ao receptor celular, o vírus da dengue entra nas células hospedeiras através de um processo de endocitose mediada por receptor (RME). A partícula viral é endocitada, e através de mudanças conformacionais induzidas pelo ambiente ácido do endossoma ocorre a fusão das membranas do endossoma e do vírus, liberando o nucleocapsídeo viral no citoplasma (MUKHOPADHYAY, KUHN, ROSSMANN, 2005). O RNA dos vírus da dengue é traduzido em associação com membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER). A replicação viral é capaz de inibir a tradução dos mRNAs celulares, como por exemplo, através do “seqüestro” do fator de iniciação de tradução eIF4E, que inibe a tradução dependente de *cap* (EDGIL, POACEK & HARRIS, 2006).

Após o início da tradução do genoma viral ocorre a troca para a síntese de um genoma de sentido negativo (3'-5') intermediário, o qual irá servir como molde para a síntese de múltiplas cópias do RNA viral de sentido positivo (5'-3'). Ciclos sucessivos de tradução produzem múltiplas cópias das 3 proteínas estruturais e das 7 não-estruturais, as quais juntamente com o RNA viral irão participar da formação, maturação e secreção da partícula viral, que ocorre no complexo de Golgi (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006; CHAMBERS et al., 1990). As partículas virais imaturas são então clivadas por proteases do tipo furina (celulares e virais), resultando na formação de partículas virais maduras, que são infectivas. Partículas sub-virais incompletas também são clivadas pelas furinas celulares e virais. A liberação das partículas virais maduras completas ou sub-virais ocorre por exocitose (MUKHOPADHYAY, KUHN, ROSSMANN, 2005; Figura 1.4).

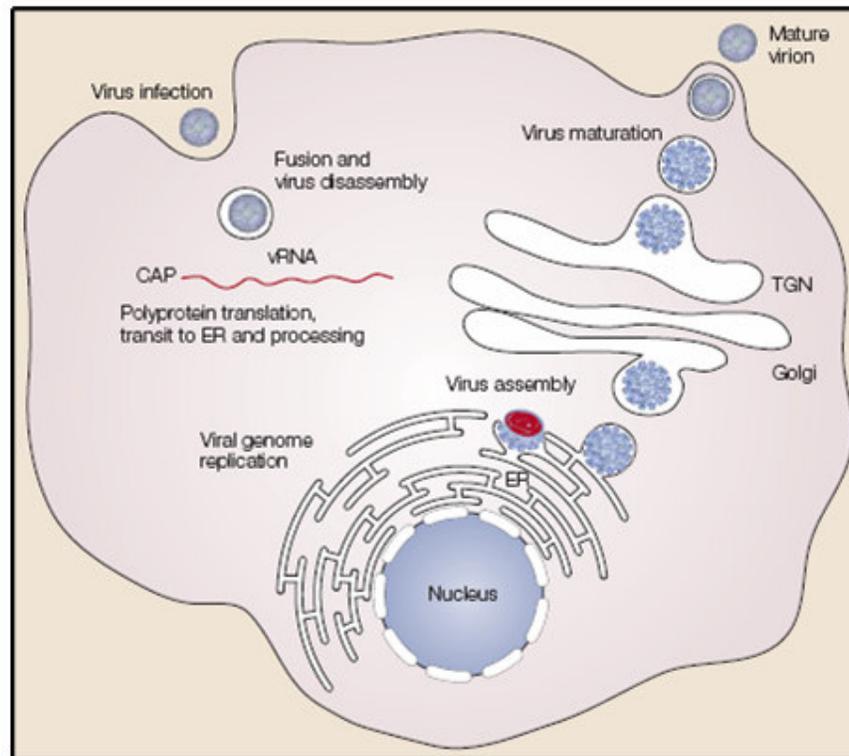


Figura 1.4: Representação esquemática da replicação do vírus da dengue. *Viral infection:* infecção viral; *Fusion and virus disassembly:* fusão e liberação da partícula viral; *CAP:* cap; *vRNA:* RNA viral; *Poliprotein translation, transit to ER and processing:* tradução da poliproteína, trânsito para o retículo endoplasmático e processamento; *Viral genome replication:* replicação do genoma viral; *Nucleus:* núcleo; *Virus assembly:* montagem; *Golgi:* golgi; *TGN:* rede trans-golgi; *Virus maturation:* maturação viral; *Mature virion:* vírus maduro. FONTE: MUKHOPADHYAY, KUHN, ROSSMANN, (2005)

1.5 Aspectos Clínicos e Patológicos

A infecção com qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue pode causar o desenvolvimento de duas formas clínicas principais: a febre da dengue (FD) e a febre hemorrágica com síndrome do choque (FHD/SCD). No entanto, cabe salientar que outras formas clínicas podem ocorrer, causando complicações hepáticas, cardíacas e neurológicas. O período de incubação da dengue varia de 3 a 14 dias e o período febril costuma durar de 2 a 10 dias (GUBLER, 1998).

O espectro da doença no ser humano varia da febre da dengue (FD), na qual ocorrem febre, mialgia, artralgia, dor retroorbital, fotofobia e linfadenopatia, até casos mais graves, onde ocorre aumento da permeabilidade vascular, trombocitopenia e

fenômenos hemorrágicos, caracterizando a febre hemorrágica da dengue (FHD) podendo ainda evoluir para a síndrome do choque da dengue (SCD) (ROTHMAN & ENNIS, 1999; WELSH & ROTHMAN, 2003). Mais recentemente, o perfil clínico da doença tem se modificado e vêm sendo relatadas complicações nos casos de FD e FHD, como encefalopatia, hepatomegalia com falha hepática fulminante e cardiomiopatia (RIGAU-PÉREZ et al., 1998; SOLOMON et al., 2000; PAHO, 2007; KABRA et al., 1998; WALI et al., 1998; Figura 1.5).

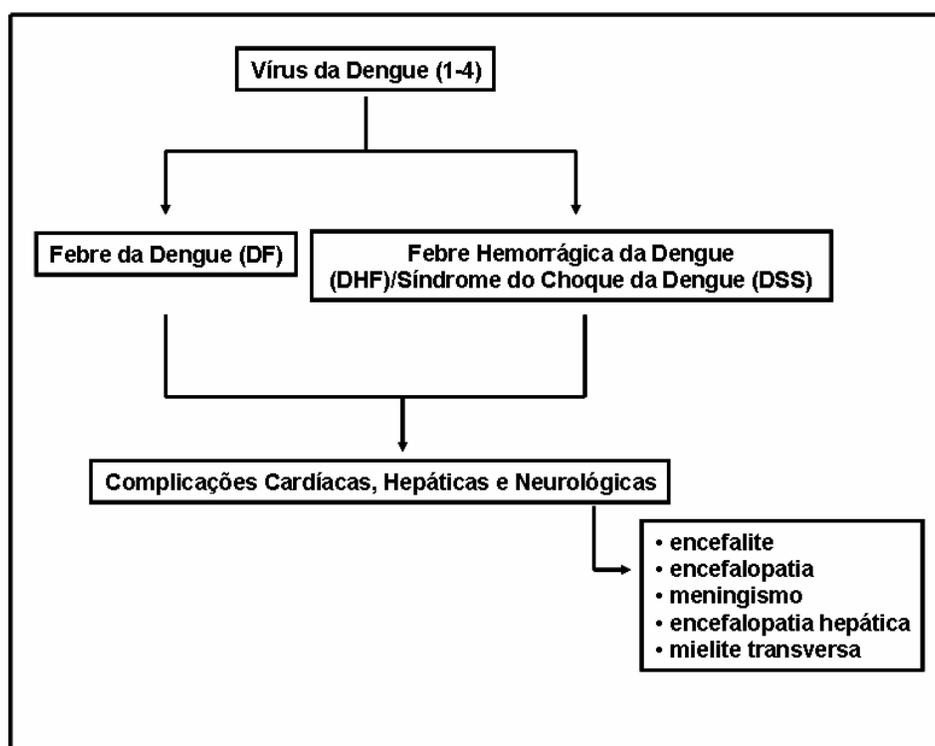


Figura 1.5: Apresentações clínicas da infecção pelo vírus da dengue. Apresentações clínicas desencadeadas após a infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue. As apresentações clínicas mais comuns após a infecção pelo vírus da dengue são: a febre da dengue (FD) e a febre hemorrágica da dengue (FHD), a qual pode evoluir para síndrome do choque (SCD). Manifestações cardíacas, hepáticas e neurológicas têm sido relatadas com mais frequência nas últimas décadas.

1.5.1 Apresentações Clínicas não usuais da Dengue

A miocardite reversível aguda tem sido relatada em pacientes infectados com o vírus da dengue. Alterações no segmento ST e nas ondas T foram detectadas no eletrocardiograma juntamente com quedas na fração de ejeção. Não foi verificada necrose no miocárdio de nenhum dos pacientes (WALI et al., 1998). Em outro trabalho, 16.7% das crianças infectadas com o vírus da dengue demonstraram disfunção ventricular esquerda quando avaliadas por ecocardiografia bidimensional e/ou *Doppler* colorido. A falha no ventrículo esquerdo pode contribuir para a hipotensão observada na FHD com SCD, o que pode ter implicações na terapia de fluídos, uma vez que a sobrecarga de fluídos pode agravar o quadro clínico (KABRA et al., 1998).

O comprometimento hepático tem sido descrito como uma das características dos casos fatais de FD e da FHD/SCD (PAHO, 2007). O quadro consiste em dano hepático com aumento nos níveis de transaminases (KUO et al., 1992; NGUYEN et al., 1997), e finalmente degeneração celular nas regiões centrolobular e zona média (INNIS, 1995). Dados histopatológicos mostram a presença de corpúsculos de Councilman, semelhantes aos encontrados na infecção pelo vírus da febre amarela. Estes corpúsculos são provavelmente resultado da fragmentação dos hepatócitos que sofrem apoptose (KERR et al., 1979; MARIANNEAU et al., 1999).

As células alvo da infecção no fígado ainda não são totalmente conhecidas, porém já foram detectados componentes do vírus da dengue em hepatócitos, células de Kupffer (INNIS, 1995) e células de hepatoma humano (HepG2) (MARIANNEAU et al., 1996). A infecção destas células com vírus da dengue induz a morte celular por apoptose nos estágios tardios da infecção, sendo este sugerido como o principal mecanismo responsável pelo dano hepático (MARIANNEAU et al., 1997).

As manifestações neurológicas mais freqüentemente encontradas em pacientes durante a infecção são: encefalite (SOLOMON et al., 2000), encefalomielite aguda disseminada (YAMAMOTO et al., 2002), polirradiculoneurite aguda (Síndrome de Guillain-Barré) (PALMA-da CUNHA-MATTA et al., 2004), mononeuropatias (PATEY et al., 1993) e ainda encefalopatia sem encefalite (CHOTMONGKOL & SAWANYAWISUTH, 2004). Os sinais clínicos da doença neurológica causada pelo vírus da dengue são: níveis reduzidos de consciência, dor

de cabeça severa, tontura, rigidez da nuca, sinais neurológicos focais, tensão na fontanela e convulsões (SOLOMON et al., 2000).

A fisiopatologia das manifestações neurológicas na infecção por dengue pode ser causada por vários fatores indiretos, como, edema cerebral, hemorragia cerebral, hiponatremia, falha hepática fulminante com encefalopatia pós-sistêmica, anóxia cerebral, hemorragia microcapilar e a liberação de produtos tóxicos (SUMARMO et al., 1983; NIMMANNITYA et al., 1987). Adicionalmente, os danos no sistema nervoso central (SNC) podem ser causados pela infecção direta do vírus no SNC, causando encefalite (BHOOPAT et al., 1996; MIAGOSTOVICH et al., 1997; RAMOS et al., 1998).

As manifestações neurológicas da dengue não são tão raras, Domingues et al., (2007) demonstraram que 18 de 85 pacientes (21,2%) com diagnóstico de dengue apresentaram alterações neurológicas, tendo como sinal clínico mais freqüente a confusão mental. A freqüência das manifestações neurológicas não foi diferente em pacientes com infecção primária ou secundária, bem como a prevalência destas manifestações não difere entre pacientes com FD e FHD. Destes pacientes, 13 foram submetidos à punção para coleta de líquido cefalorraquidiano, sendo que em 7 foi detectado vírus por RT-PCR. Destes, 3 apresentaram RT-PCR negativo no soro (no mesmo dia da coleta do líquido), o que sugere que o vírus da dengue pode entrar no SNC diretamente, sem ser carregado por células periféricas infectadas, mecanismo conhecido como “cavalo-de-tróia”, conforme sugerido por Miagostovich et al., (1997). Foi demonstrado, em modelo murino, que o vírus da dengue é capaz de entrar diretamente no SNC, através do aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica, induzida pela secreção de uma citocina conhecida como fator citotóxico (FC) durante a infecção (CHATURVEDI et al., 1991).

Em estudos realizados no Vietnã as complicações neurológicas em casos de dengue tiveram uma incidência entre 0.5-1% (SOLOMON et al., 2000; CAM et al., 2001). Cam et al., (2001) estudaram 27 pacientes com manifestações neurológicas da dengue, e demonstraram por ressonância magnética que edema cerebral e encefalite são as alterações mais prevalentes. Adicionalmente, todos os pacientes com manifestações neurológicas da dengue apresentaram níveis elevados de aspartato (AST) e alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina e bilirrubinas.

Visando desenvolver um modelo murino para estudar a patogenia do DENV-1 no sistema nervoso central (SNC), Dèspres et al., (1998) geraram através de passagens sucessivas e seriadas em cérebro de camundongos e células de inseto (AP61), variantes neurovirulentas do DENV-1. As variantes neurovirulentas FGA/NA d1d e FGA/NA a5c replicam com maior eficiência no SNC dos camundongos e levam os animais a óbito com sinais de encefalite. A apoptose, mais intensamente observada nos animais infectados com as cepas neurovirulentas em comparação com a parental, foi um dos principais achados que podem explicar a maior patogênese das cepas neurovirulentas. Mutações na proteína E e na porção helicase da NS3 da cepa neurovirulenta FGA/NA d1d foram definidas como possíveis marcadores moleculares de virulência (DÈSPRES et al., 1998; DUARTE DOS SANTOS et al., 2000).

1.6 Patogenia da Febre da Dengue (FD) e da Febre Hemorrágica da Dengue (FHD)

Apesar dos grandes avanços dos últimos anos para o entendimento da biologia do vírus da dengue, como a determinação da estrutura tridimensional da partícula viral e de grande parte de suas proteínas e melhor compreensão da replicação e tradução das proteínas virais, a patogenia da dengue continua sendo um grande desafio. Uma complexa rede de interações entre fatores virais e do hospedeiro, acabam por desencadear as duas principais apresentações clínicas da doença, a febre da dengue (FD) e a febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD) (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006). Vários são os fatores de risco para o desenvolvimento de formas severas da doença, como, infecção prévia (HALSTEAD, 1970), idade (GUZMAN et al., 2002a), sorotipo e genótipo viral (GUBLER, 1998; BALMASEDA et al., 2006), componentes genéticos do hospedeiro (HALSTEAD et al., 2001), entre outros.

A falta de um modelo animal que reflita os sintomas da FHD e da SCD consiste em grande obstáculo para o entendimento da patogenia da dengue (GUBLER, 1998). Recentemente alguns modelos potenciais foram desenvolvidos, como por exemplo, a avaliação da replicação viral em culturas primárias de

monócitos/macrófagos humanos, ou ainda em células dendríticas (BENTE & RICO-HESSE, 2006). Primatas não-humanos (PNH) mostraram-se suscetíveis a infecção, sendo observado nestes animais viremia branda e transiente e produção de anticorpos, porém, sem sinais de doença. A mesma situação ocorre com os modelos murinos, com a maior parte dos animais testados desenvolvendo viremia que induz a produção de anticorpos. Recentemente, alguns modelos murinos baseados em camundongos *knockouts* e quiméricos (humano-murino) produziram sinais clínicos de FD e FHD (BENTE & RICO-HESSE, 2006).

1.6.1 Teoria dos Anticorpos Potencializadores da Infecção

A teoria mais aceita para explicar a FHD e a SCD é a dos anticorpos potencializadores da infecção (do inglês, *antibody dependent enhancement*, ADE). Segundo esta hipótese, inicialmente sugerida por Halstead em 1970, os pacientes que sofrem uma segunda infecção por um vírus de sorotipo heterólogo apresentam uma chance maior de desenvolver FHD/SCD (HALSTEAD, 1970 e 1988). Os anticorpos heterólogos pré-existentes reconhecem o vírus infectante, ocorrendo a formação de complexos antígeno-anticorpo, os quais acabam sendo reconhecidos e internalizados por células mononucleares, especialmente macrófagos, através de seus receptores para a porção constante dos anticorpos (Fc). Uma vez que os anticorpos heterólogos não são neutralizantes as partículas virais acabam por replicar dentro do macrófago, exacerbando a infecção (GUBLER, 1998). Adicionalmente, anticorpos homólogos (ou homotípicos) em níveis sub-neutralizantes também são capazes de potencializar a infecção pelo vírus da dengue pelo mesmo mecanismo (HALSTEAD & O'ROURKE, 1977). Dados laboratoriais *in vitro* e epidemiológicos *in vivo* reforçam a teoria do ADE (HALSTEAD, 1988; Figura 1.6).

Uma das provas mais importantes a favor da teoria do ADE é o exemplo do que ocorreu em Cuba. A dengue não era transmitida em Cuba desde a segunda Guerra Mundial (1939-1945), até os anos de 1977-1978 quando uma epidemia de dengue sorotipo 1 acabou por infectar aproximadamente 40% da população em todos os grupos etários, causando uma forma branda da doença (HALSTEAD, 1988;

CANTELAR de FRANCESCO, 1983). Em 1981, o vírus da dengue sorotipo 2 foi introduzido em Cuba, vindo da Ásia, causando novamente uma grande epidemia, desta vez, com casos FHD/SCD. Testes sorológicos em pacientes com casos graves da doença (FHD/SCD) demonstraram a presença de anticorpos heterólogos (KOURI et al., 1983). Conforme esperado, crianças com 1 e 2 anos de idade não apresentaram doença grave (e não evoluíram para óbito), uma vez que haviam nascido após a epidemia de 1977-1978, não tendo sido infectadas com o sorotipo 1 do vírus. Porém, foi demonstrado que crianças com menos de 1 ano que desenvolveram FHD/SCD durante a infecção primária com o sorotipo 2 do vírus, haviam nascido de mães imunes para a dengue, e apresentavam anticorpos maternos circulantes (HALSTEAD, 1988).

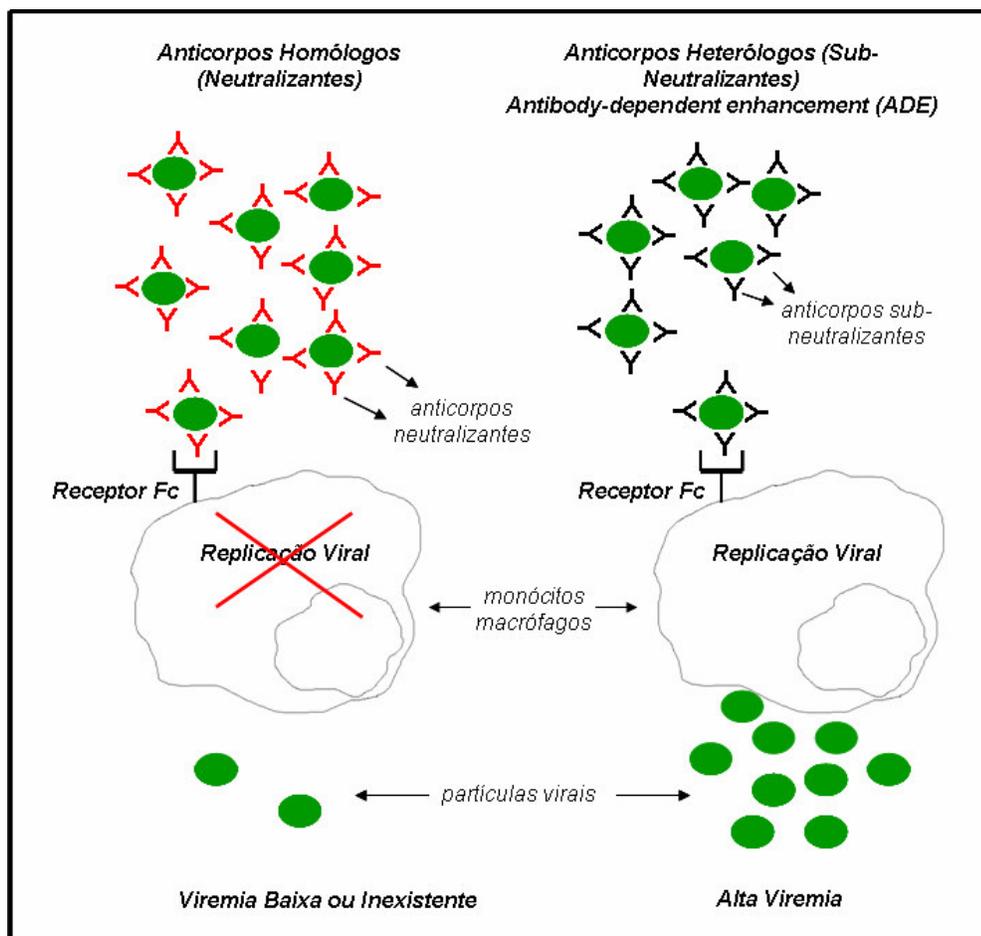


Figura 1.6: Representação esquemática do fenômeno dos anticorpos potencializadores da infecção. Representação esquemática do mecanismo de *antibody-dependent enhancement* (ADE) desencadeado por anticorpos sub-neutralizantes pré-existentes contra um sorotipo heterólogo do vírus da dengue.

Uma das conseqüências da maior infectividade de monócitos/macrófagos desencadeada pela ADE reside na produção da “cascata de citocinas”. Após uma infecção natural por um sorotipo da dengue, são produzidos linfócitos de memória CD4⁺ e CD8⁺. Linfócitos T CD4⁺ produzem uma grande variedade de citocinas, como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e linfotóxina. Adicionalmente, monócitos/macrófagos que são infectados produzem fator de necrose tumoral (TNF), IL-1, IL-1 β , IL-6 e fator ativador de plaquetas (PAF). Deste modo, uma complexa rede de citocinas e mediadores químicos são induzidos, apresentando efeitos sinérgicos que acabam por aumentar a permeabilidade vascular. No entanto, não existe ainda um consenso sobre as citocinas predominantemente produzidas em casos de FD e em casos graves de FHD/SCD (MALAVIGE et al., 2004; KING et al., 2000). De acordo com Chaturvedi et al., (1999) os níveis séricos de TNF- α , IL-2, IL-6 e IFN- γ encontram-se elevados nos três primeiros dias da doença, enquanto que os níveis de IL-10, IL-5 e IL-4 tendem a subir mais tardiamente. Desta forma, estes autores sugerem que uma resposta Th1 ocorre nos momentos iniciais da infecção, alterando-se o seu perfil para Th2 com o passar do tempo.

Níveis elevados de IL-13 e IL-18 também têm sido relatados em infecções graves com o vírus da dengue, especialmente em pacientes com grau IV de FHD. Contrariamente, níveis de IL-12 são elevados em pacientes com FD quando comparados com pacientes em grau III e IV de FHD. Níveis de fator de crescimento transformante do tipo beta (TGF- β ; citocina de perfil Th3), também têm sido encontrados em pacientes com doença grave (MUSTAFA et al., 2001). Estes dados sugerem a predominância de um perfil de resposta Th2 em casos de FHD/SCD, enquanto que as citocinas do tipo Th1 são mais prevalentes em casos benignos da dengue (MALAVIGE et al., 2004).

Outras citocinas importantes na patogenia da dengue, são a IL-6 e a IL-8. A IL-6 funciona como um pirógeno endógeno aumentando a permeabilidade de células endoteliais. A IL-8, juntamente com a elastase secretada por neutrófilos ativados facilita o dano endotelial por estas células, ativa o complemento, coagulação e a cascata fibrinolítica. Desta forma, ambas as citocinas estão aumentadas em casos graves de FHD/SCD (JUFFRIE et al., 2000, 2001)

Um dos efeitos importantes da produção de citocinas pode ser demonstrado pela produção de IFN- γ por células CD4⁺ vírus-específicas. O IFN- γ produzido por estas células induz uma maior expressão de receptores do tipo Fc na membrana de monócitos/macrófagos, aumentando a infecção destas células pelo vírus da dengue, de acordo com o mecanismo de ADE. Monócitos/macrófagos infectados acabam por ativar células T, resultando na produção de mais citocinas e mediadores químicos, formando um ciclo de retro-alimentação que deve ser finamente regulado de forma a evitar o agravamento da doença (PANG, CARDOSA e GUZMAN, 2007; Figura 1.7).

A hipótese de que a FHD é causada por fatores predominantemente imunológicos associados a infecções secundárias é fortemente sustentada pelo fato de que 90% dos pacientes que desenvolvem a forma mais severa da doença apresentam evidências sorológicas de uma infecção prévia (SUAYA, SHEPARD e BEATTY, 2006). Além disso, casos de FHD ocorrem preferencialmente em áreas onde há a circulação de múltiplos sorotipos e costumam acometer habitantes dessas regiões, enquanto que visitantes manifestam a forma clássica da doença (ROTHMAN, 1997). Deste modo, a re-infecção com um sorotipo heterólogo do vírus da dengue leva a uma alta taxa de replicação viral (mediada por anticorpos não-neutralizantes), ocasionando a ativação de células T de memória e a secreção de várias citocinas e mediadores químicos. Estes compostos secretados principalmente de células T, monócitos/macrófagos e células endoteliais levam a um aumento na permeabilidade vascular e ao agravamento da doença (PANG, CARDOSA e GUZMAN, 2007).

Ao contrário, um estudo na Tailândia demonstrou que a incidência de FHD/SCD em crianças que sofreram uma segunda infecção com sorotipo heterotípico variava entre 0.5-20.0 em cada 100 crianças. Adicionalmente, em um estudo prospectivo em Bangkok, que acompanhou por 3 anos 1.700 crianças com idade escolar, entre 1978 e 1980, de 41 crianças com infecções secundárias pelo vírus da dengue, apenas 9 apresentaram doença, e 7 foram hospitalizadas (HALSTEAD, 1988). Estes estudos deixam claro que a teoria do ADE, apesar de contribuir para explicar a severidade da dengue, não é a única causa da FHD/SCD. Um outro resultado que contradiz a teoria dos anticorpos potencializadores da infecção como um fator de risco para o desenvolvimento de FHD/SCD, é o fato de que apenas 2-4% dos pacientes que sofrem uma infecção secundária desenvolvem as formas graves (GUZMÁN & KOURI, 2002b).

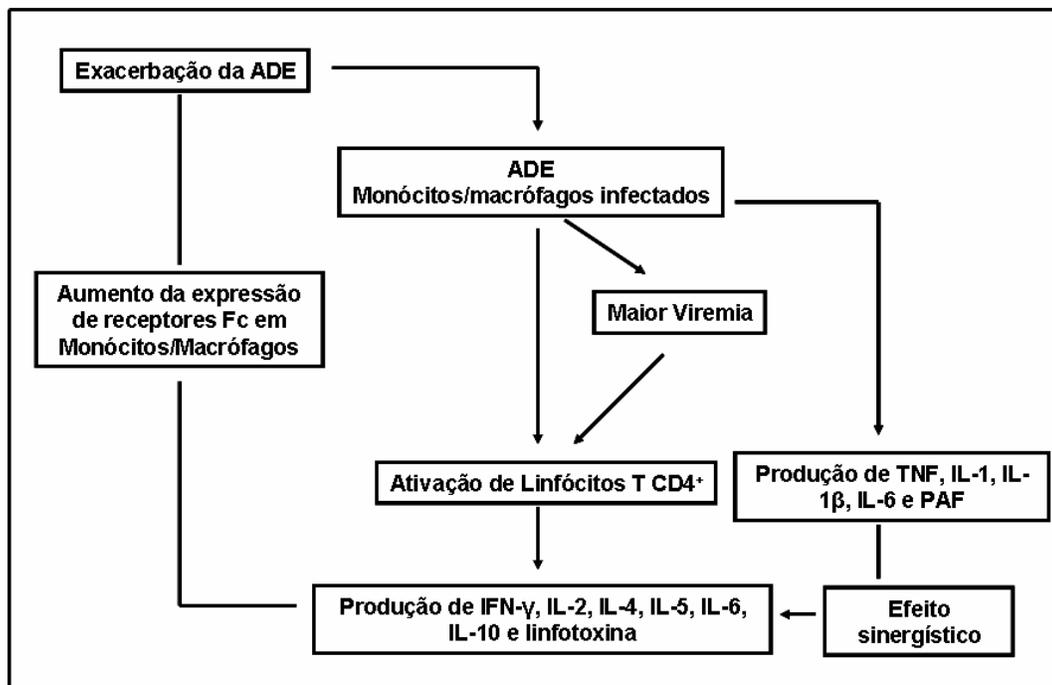


Figura 1.7: Representação esquemática do modelo de imunopatogenia da dengue. Representação esquemática do modelo de imunopatogenia da dengue complementar ao modelo de *antibody-dependent enhancement* (ADE).

A observação de que casos de FHD acontecem em infecções primárias e de que nem todas as infecções secundárias resultam em FHD sugere que outros fatores devem contribuir para a severidade da doença. Entre eles pode-se citar o estado imunológico, características genéticas do hospedeiro (HALSTEAD, 1988; KOURI et al., 1989; SAKUNTABHAI et al., 2005; SIERRA et al., 2006) e alterações na seqüência nucleotídica das cepas, que podem afetar sua virulência (LEITMEYER et al., 1999; RICO-HESSE et al., 1997; VAUGHN et al., 2000; WATTS et al., 1999). Esses fatores podem, por exemplo, influenciar na magnitude da viremia, que apesar de não explicar a maior severidade da FHD/SCD, é certamente um fator de agravo na dengue (LIBRATY et al., 2002; VAUGHN et al., 2000).

1.6.2 O papel das células T no desenvolvimento da FHD

Além da participação dos anticorpos na gênese da FHD, foi recentemente caracterizado que linfócitos T de memória ativados em uma infecção secundária

com sorotipo heterólogo podem contribuir para o desenvolvimento da FHD, em um modelo conhecido como teoria do pecado original de células T (do inglês *original antigenic sin*). Os linfócitos T ativados em uma infecção secundária com sorotipo heterólogo apresentam baixa afinidade para o sorotipo do vírus causador da infecção, não sendo eficientes em eliminá-lo, aumentando a viremia e contribuindo para o desenvolvimento da FHD (MONGKOLSAPAYA et al., 2003). Foi demonstrado que em muitos pacientes com infecção secundária heteróloga aguda pelo DENV, os linfócitos T CD8⁺ gerados ligam-se fracamente ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que apresentam epítomos do vírus causador da infecção. Ao contrário, estes linfócitos ligam-se mais fortemente aos epítomos do vírus causador da infecção primária, além de, apresentarem um fenótipo apoptótico que parece destinar estas células a morte celular programada antes de exercerem sua função antiviral e controlarem a infecção (MONGKOLSAPAYA et al., 2003; Figura 1.8).

Deste modo, a seleção para a expansão de linfócitos T de memória com baixa afinidade parece competir com a ativação de linfócitos T *naïve* (virgens), os quais apresentam alta afinidade pelos antígenos virais. Esta ativação cruzada altera o repertório de células T ativadas em uma infecção secundária, gerando uma maior ativação destas células, bem como, a produção de um perfil citocinas alterados em pacientes com FHD (MATHEW & ROTHMAN, 2008).

Mais recentemente, foi investigado o papel das células T regulatórias (T reg) na patogenia da dengue, uma vez que estas células desempenham um papel importante no controle da resposta imune (SAKAGUCHI 2004). Pacientes com infecção aguda pelo vírus da dengue com diferentes graus de severidade não apresentaram diferença no fenótipo das células T reg, sendo que em todos os pacientes estudados estas células expressaram seus marcadores característicos, CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺. Além disso, estas células mantêm a capacidade de suprimir a função dos linfócitos T, bem como, de secretarem IL-10 (LÜHN et al., 2007).

No entanto, foi demonstrado que as células T reg são capazes de reduzir *in vitro* a produção de citocinas vasoativas, como o IFN- γ , TNF- α e IL-6, em células T e monócitos após estimulação com o DENV. Adicionalmente, a frequência de células T reg e a relação entre estas células e as células T efetoras encontraram-se aumentadas em pacientes com formas mais brandas da doença (especialmente em

crianças), ao contrário dos pacientes com formas graves, os quais apresentavam menor relação de células T reg/T efetoras (LÜHN et al., 2007).

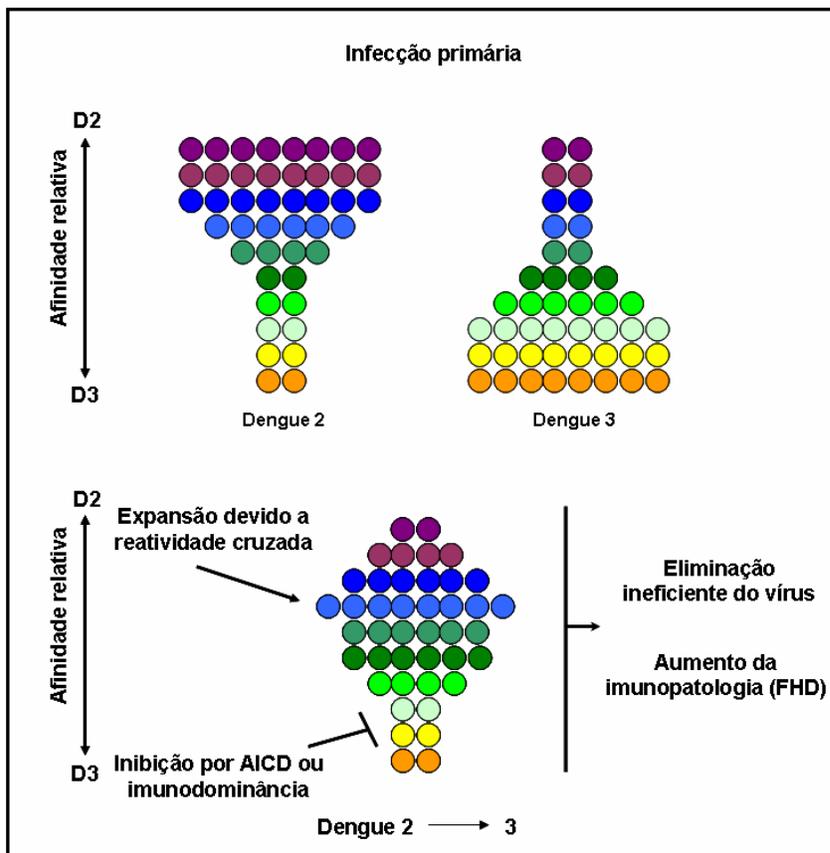


Figura 1.8: Representação esquemática do modelo do pecado original de linfócitos T. Segundo este modelo, em uma infecção secundária por sorotipo heterólogo ocorre uma ativação importante de linfócitos T de memória para o sorotipo causador da infecção primária, os quais apresentam baixa afinidade de ligação com o segundo vírus. Em última análise isto pode levar a uma eliminação ineficiente do vírus, com aumento da viremia e da imunopatologia. Modificado de MONGKOLSAPAYA et al., 2003.

1.6.3 Fatores Virais

Outro fator relevante para explicar a maior gravidade dos casos de FHD/SCD, é que os vírus da dengue, como outros vírus RNA, sofrem mutações em seu genoma, como resultado de uma pressão seletiva para que possa replicar em

humanos e mosquitos, e que algumas cepas virais acabam por desenvolver um maior potencial epidêmico. A expressão fenotípica destas mudanças no genoma viral pode incluir maior replicação viral e viremia, ocasionando uma maior severidade da doença (GUBLER, 1998; ROSEN, 1977).

Vários autores demonstraram que uma única mutação de aminoácido no genoma dos flavivírus pode alterar a patogenicidade da amostra *in vivo* e *in vitro*. Lui et al., (2006) demonstraram que uma única alteração de aminoácido na proteína NS2A do vírus da Febre do Nilo Ocidental (WNV) faz com que o vírus perca sua habilidade de inibir a via de sinalização de IFN- α e - β , reduzindo deste modo, sua virulência em modelo murino. Beasley et al., (2005) evidenciaram que a maior patogenicidade da cepa de WNV New York 1999 (NY1999) comparada com a cepa An4766 (cepa do Velho Mundo) está relacionada a mutações na proteína E, que acarretam alterações na glicosilação da proteína e conseqüente perda da estabilidade da mesma em pH ácido.

Outro exemplo é a menor patogenicidade das cepas de DENV-2 que circulam nas Américas comparadas com as cepas Asiáticas. Foi demonstrado que uma mutação na posição 390 da proteína E é a responsável pelo menor poder infectivo das cepas americanas (E390, Asp) em relação às cepas asiáticas (E390, Asn). A menor patogenicidade da cepa americana está relacionada à sua menor capacidade de replicar em macrófagos e células dendríticas (PRYOR et al., 2001; COLOGNA, ARMSTRONG & RICO-RESSE, 2005). Sánchez & Ruiz (1996) caracterizaram uma mutação na mesma posição (390) da proteína E (asparagina para histidina) do vírus dengue sorotipo 2 (200787/1983), isolado no México, que acarreta um fenótipo neurovirulento para camundongos recém-nascidos.

Em um estudo realizado por Sabin (1952), foi possível demonstrar que passagens sucessivas do vírus da dengue em cérebro de camundongos produzem mutantes altamente virulentos para camundongos e macacos. No entanto, mutantes gerados desta forma são normalmente atenuados para humanos. Desta forma, esta geração de vírus mutantes por passagens seriadas em SNC de camundongos representa um modelo útil para estudo das bases moleculares de neurovirulência para macacos e camundongos e de atenuação para humanos (KAWANO et al., 1993). Dèspres et al., (1998), através da neuroadaptação de um isolado de dengue sorotipo 1 em camundongos, demonstrou que mutações na proteína E e na porção helicase da proteína NS3 do DENV-1 poderiam ser as responsáveis pela aquisição

do fenótipo de neurovirulência para camundongos. Kawano et al., (1993) em um trabalho semelhante demonstrou que os marcadores moleculares de neurovirulência em DENV-4 estão localizados na proteína de envelope, nas posições 155 (isoleucina para uma treonina) e 401 (leucina para uma fenilalanina).

Além da patogenicidade para camundongos e humanos, mutações também podem ocasionar uma maior infectividade de mosquitos vetores. A substituição de uma serina por uma asparagina, na proteína E2 do vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEEV) causou um epidemia de VEEV em 1993 e 1996 no México (BRAULT et al., 2004). Mandl et a., (2000) demonstraram que a mutação de treonina para uma lisina na posição 310 da proteína E do vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBE), atenua seu fenótipo em camundongos. No entanto, uma mutação compensatória na posição 311 (lisina para glutamina) reverte o vírus para seu fenótipo virulento natural.

Os resultados descritos comprovam a alta capacidade que os vírus de RNA apresentam em alterar suas seqüências gênicas, de forma a obterem alguma vantagem adaptativa. Esta habilidade permite que os vírus da dengue repliquem em hospedeiros vertebrados e invertebrados, além de representarem uma ameaça constante devido à possibilidade de emergência de cepas virais com maior virulência. Esta maior virulência poderia estar associada ao surgimento de novos surtos epidêmicos, bem como de formas mais graves da FD e FHD/SCD.

1.6.4 Variabilidade Genética do Hospedeiro

Dados epidemiológicos sugerem que fatores relacionados aos hospedeiros, como, idade, sexo e etnia influenciam na severidade da doença. Em uma pesquisa realizada durante uma epidemia de dengue em Cuba, em 1981, observou-se que dos 124 casos de choque ocorridos entre as crianças, apenas 14% dos pacientes eram negros ou mulatos. Além disso, as taxas de morte registradas foram cinco vezes mais elevadas em crianças do que em adultos (GUZMÁN et al., 1984). Adicionalmente, casos de FHD/SCD não têm sido reportados na África, bem como, raros casos ocorrem em ilhas Caribenhas onde a população é predominantemente negra. Apesar disto, um estudo soro-epidemiológico retrospectivo em Havana,

demonstrou não haver diferença na susceptibilidade de nenhum grupo étnico à infecção pelo vírus dengue (HALSTEAD, 1988). Um estudo realizado na Tailândia demonstrou que mulheres com idade entre 4 e 14 anos foram hospitalizadas devido à infecção por dengue em taxas duas vezes maiores que homens, o que também foi observado na epidemia Cubana (HALSTEAD et al., 1988).

Fatores genéticos do hospedeiro têm sido pouco estudados como possíveis determinantes da variabilidade na susceptibilidade à infecção pelo vírus da dengue. O fato de não ocorrerem casos de FHD no Haiti e poucos casos de FHD na África, ambas regiões hiperendêmicas e com a co-circulação dos quatro sorotipos, chama a atenção para possíveis fatores relacionados à variabilidade genética do hospedeiro (GUZMÁN & KOURI, 2002a; MALAVIGE et al., 2004).

Um dos principais alvos para os estudos de polimorfismos associados com a susceptibilidade à infecção pelo vírus da dengue são os genes dos antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*). Polimorfismos no HLA classe I têm sido associados com a susceptibilidade para a FHD, enquanto não foi encontrada associação com polimorfismos nos genes do HLA-DRB1 e TNF (LOKE et al., 2001). Soundravally & Hoti (2007) demonstraram que polimorfismos nos genes que codificam para as proteínas transportadoras associadas a antígeno (do inglês, *Transporter Associated with Antigen Processing*), TAP1 e TAP2 podem estar relacionados com maior ou menor susceptibilidade a FHD. A influência dos polimorfismos nos genes da via de apresentação de antígeno (HLA I e TAP) reside na possível seleção de antígenos virais que serão apresentados na superfície celular para as células T CD8⁺ vírus-específicas, as quais têm papel importante na patogenia da FHD (LOKE et al., 2001).

A presença de polimorfismos em genes que codificam para receptores virais nas células hospedeiras também parece ser relevante na patogenia da FHD. Foi demonstrado que os genótipos GG e GA da variante DC-SIGN1-336, um receptor do vírus da dengue essencial para a infecção de células dendríticas, são raramente encontrados em pacientes com FD comparados aos pacientes com FHD (SAKUNTABHAI et al., 2005). Uma vez que as citocinas secretadas durante a infecção têm papel importante na patogenia da dengue, polimorfismos nestes genes também podem ser relevantes para a maior susceptibilidade ou resistência à infecção pelos vírus da dengue. Fernandez-Mestre et al., (2004) estudaram polimorfismos nucleotídicos nos genes do TNF- α , INF- γ , IL-6, TGF- β 1 e IL-10 de

pacientes com infecções pelo vírus da dengue, e encontraram uma maior incidência do alelo TNF-308A em pacientes com FHD.

A disponibilidade de um número cada dia maior de polimorfismos detectados no genoma humano, vai aumentar o potencial para os estudos de susceptibilidade genética à dengue, bem como, poderá trazer novas explicações para a patogenia de formas graves, e seu tratamento (MALAVIGE et al., 2004).

1.7 Estudo da Interação Flavivírus-Hospedeiro

Conforme visto anteriormente, a patogenia da dengue é dependente de uma complexa rede de fatores, que envolvem a hiperendemicidade, a resposta imune do hospedeiro à infecção, o perfil genético do hospedeiro, fatores virais, idade, raça, entre outros. Schena et al. (1995) desenvolveram a tecnologia de microarranjos de DNA e descreveram sua aplicabilidade na quantificação de um pequeno conjunto de genes de *Arabidopsis thaliana*. O aprimoramento da tecnologia de microarranjos de DNA permitiu a análise em larga escala da resposta do hospedeiro (células ou tecidos) a microorganismos, como vírus, bactérias, protozoários, Leveduras e helmintos (FINK et al., 2007).

Com relação à infecção pelo vírus da dengue, o primeiro estudo utilizando esta tecnologia foi publicado em 2003, por Warke e colaboradores. Neste trabalho os autores estudaram a interação entre células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) com os vírus DENV-2 e DENV-3, utilizando differential display acoplado a RT-PCR, microarranjo (Genechip da Affymetrix) e RT-PCR quantitativo. Os autores demonstraram que a infecção de células HUVECs com o DENV-2 e DENV-3, induz a expressão de genes da via de IFN e de defesa imunológica, como 2'-5'oligoadenilato sintetase (OAS), proteína de resistência a mixovírus A (MxA), TNF- α , entre outros.

Adicionalmente foi avaliado o efeito da infecção pela cepa New Guinea C (NGC) do vírus DENV-2, em células de linhagem endotelial humana ECV304. Os resultados mostraram a modulação de 111 genes, sendo que 21 se encontravam super-expressos e 90 suprimidos. As vias de sinalização mais afetadas foram

aquelas relacionadas ao ciclo celular, apoptose, tráfico celular por membranas e citoesqueleto (LIEW & CHOW, 2006).

A resposta de macrófagos (alvo primário da infecção) humanos à infecção pelo vírus da dengue foi inicialmente avaliada por Moreno-Altamirano et al. (2004). Estes autores derivaram macrófagos humanos de sangue periférico de doadores saudáveis e analisaram, através de um microarranjo contendo sondas para 375 genes de citocinas, o efeito da infecção pelo DENV-2 (cepa 200787/1983, isolada no México). Um total de 25 genes apresentavam-se modulados (super-expressos ou suprimidos), os quais podem ter papel na patogenia da dengue, como o gene para IL-8, que se encontrava 6,4 vezes aumentado após 6h de infecção.

Recentemente, foi demonstrado que a infecção de linfócitos B, macrófagos e células polimorfonucleares (PBMC) de macacos com DENV-1 induz a expressão de uma potente resposta imune após 5 dias de infecção. Esta resposta é fortemente caracterizada pela expressão de genes estimulados por IFN (ISGs) que apresentam atividade antiviral. No entanto, não foi detectada a superexpressão de genes de citocinas, como IL-10, IL-8, IL-6, TNF- α , IFN- α , - β e - γ , sabidamente envolvidos na patogenia da dengue. A ausência destas citocinas pode explicar porque macacos não apresentam sinais clínicos da infecção pelo vírus da dengue, apesar de serem susceptíveis à infecção e realizarem soroconversão (SARIOL et al., 2007).

Visando analisar a resposta das principais células-alvo durante a infecção pelo vírus da dengue, foi realizado um estudo do transcriptoma de leucócitos do sangue periférico de 14 pacientes com FHD. Foi verificada a expressão de uma grande quantidade de genes do ciclo celular e do retículo endoplasmático (RE), o que pode sugerir uma resposta proliferativa acompanhada de estresse no RE. Além disso, genes associados à resposta imune, como marcadores de superfície celular, imunoglobulinas e elementos de resposta inata encontravam-se elevados. Adicionalmente, foi possível demonstrar que pacientes com SCD expressam em menores níveis 24 genes, muitos dos quais estão associados à resposta de IFN tipo I (α e β), o que sugere que a SCD pode ser desencadeada pela atenuação em alguns aspectos da resposta imune inata (SIMMONS et al., 2007).

FINK et al. (2007) estudaram a resposta de linhagens celulares ao DENV-2 (cepa TSV01) e de sangue periférico de pacientes com infecção aguda com o DENV-1 e -3. Os resultados demonstraram a super-expressão de genes de três vias principais: a de iniciação de resposta imune via NF- κ B, IFN tipo I e via ubiquitina-

proteossomo. A caracterização funcional de alguns dos genes modulados mostrou que a super-expressão da viperina, ou ainda o bloqueio da via proteossomo-ubiquitina ocasionaram uma redução significativa na replicação viral. Estudos da interação entre flavivírus-hospedeiro utilizando-se tecnologias de análise genômica em larga escala são de grande importância para o melhor conhecimento da patogenia da infecção pelo vírus da dengue. Os alvos selecionados por estes estudos podem servir como biomarcadores para a doença, ou ainda para controle da replicação viral, representando alvos para terapia com drogas (FINK et al., 2007).

2. Justificativa e Objetivos

As arboviroses constituem atualmente um grave problema de saúde pública mundial, devido a fatores como o crescimento populacional, urbanização de áreas de mata, falta de programas efetivos para o controle do vetor e aumento das viagens internacionais. Dentre as arboviroses, a dengue figura como a mais importante, afetando entre 50 a 100 milhões de pessoas por ano no mundo todo, e causando aproximadamente 25.000 óbitos (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006; GUBLER, 1998). Até o momento nenhuma vacina ou terapia antiviral específica contra os quatro sorotipos da dengue está disponível.

O surgimento de novas apresentações clínicas da FHD/SCD, como o envolvimento neurológico e a dengue visceral, trazem novos questionamentos sobre a patogênese da infecção (SOLOMON et al., 2000). Visando estudar os marcadores moleculares virais responsáveis pela aquisição do fenótipo de neurovirulência em DENV-1, Dèspres et al. (1998) realizaram a neuroadaptação de um isolado de DENV-1 em camundongos. O isolado FGA/89, obtido de um caso de FD na Guiana Francesa no ano de 1989 foi passado sucessiva e seriadamente em cérebro de camundongos suíços recém-nascidos e culturas de células de inseto AP61. Após 6 passagens sucessivas, dois isolados neurovirulentos foram obtidos, FGA/NA d1d e FGA/NA a5c. O genoma da cepa FGA/NA d1d foi completamente seqüenciado e comparado com o genoma da cepa parental FGA/89 (não-neurovirulenta). Foram detectadas 2 mutações na proteína E e uma na porção helicase da proteína NS3, que poderiam ser as responsáveis pelo fenótipo de neurovirulência. A cepa FGA/NA a5c foi apenas parcialmente seqüenciada e a caracterização fenotípica desta cepa não foi realizada, uma vez que foi considerada não estabilizada em nível genômico (DÉSPRES et al., 1998).

As cepas FGA/89 e FGA/NA a5c foram gentilmente cedidas pelo Dr. Philippe Dèspres, da *Unité des Interactions Moleculaires Flavivirus-Hôtes* do Instituto Pasteur de Paris (França). Uma vez que esta cepa não foi estudada com maior profundidade, um dos objetivos do presente trabalho foi realizar a caracterização biológica da cepa neuroadaptada, FGA/NA a5c, e determinar os marcadores moleculares responsáveis pela aquisição do fenótipo neurovirulento desta cepa.

Adicionalmente, a resposta do hospedeiro à infecção pelo vírus da dengue constitui-se em parte importante no desenvolvimento, ou não da patogenia. O desenvolvimento das técnicas de hibridização competitiva em microarranjos de DNA (*microarray*) e *genechips* têm permitido a caracterização de inúmeras funções biológicas que células/tecidos e microorganismos apresentam em diferentes condições ambientais (GEIMONEN et al., 2002; CHERKASOVA et al., 2003). Desta forma, o conhecimento da resposta do hospedeiro à infecção pelo vírus da dengue pode contribuir para melhorar o entendimento da patogênese observada durante a infecção por este vírus. Deste modo, além dos marcadores moleculares responsáveis pela neurovirulência da cepa FGA/NA a5c e de sua caracterização biológica, foram avaliadas as diferenças na resposta do sistema nervoso central (SNC) de camundongos infectados pelas cepas parental (FGA/89) e neurovirulenta (FGA/NA a5c) visando compreender diferentes aspectos da infecção pelo vírus dengue no SNC murino, e ainda fornecer possíveis alvos para intervenção clínica.

O presente trabalho teve como objetivos:

- Realizar a caracterização biológica das cepas virais FGA/NA a5c e FGA/89 *in vivo*, utilizando-se camundongos suíços recém-nascidos e *in vitro*, em culturas primárias e de linhagens celulares;
- Realizar o seqüenciamento genômico completo da cepa neurovirulenta FGA/NA a5c e determinar, por comparação com a cepa parental FGA/89, os marcadores moleculares de virulência possivelmente responsáveis pelo fenótipo neurovirulento;
- Realizar a caracterização genômica funcional, utilizando técnicas de microarranjo de DNA, do sistema nervoso central de camundongos infectados com as cepas FGA/89 (não-neurovirulento) e FGA/NA a5c (neurovirulento);
- Avaliar os genes e as vias diferencialmente expressos durante a infecção do SNC de camundongos com as cepas FGA/89 e FGA/NA a5c.

3. Animais e Métodos

3.1 Cultura de Células

As culturas primárias de neurônios murinos (NP) foram realizadas conforme descrito por Graner et al., (2000). Brevemente, fêmeas gestantes de camundongos suíços (com 16 dias de gestação) foram sacrificados por deslocamento cervical. Os fetos foram retirados e sacrificados em câmara de CO₂, de modo asséptico. No laboratório os mesmos foram dissecados para retirada do hipocampo, que foi digerido com tripsina (0,05%). As células foram contadas e plaqueadas em câmaras do tipo *LabTek™ Chamber Slides™* (Nunc™, Rochester, NY) previamente tratadas com Matrix Gel (15 µg/mL) em meio de cultivo *Neurobasal™ Medium* suplementado com B-27 (Gibco), 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina/estreptomicina (50UI/mL e 50µg/mL) (Gibco Laboratories). Após as primeiras 24h de cultivo o meio foi trocado para um meio sem SFB.

As culturas de macrófagos peritonias de camundongos (MPC) foram preparadas inoculando-se camundongos suíços adultos (~60 dias) com 3 mL de uma solução 3% de tioglicolato (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Após 3 dias os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seu peritônio lavado 2x com solução fisiológica contendo 20 UI/mL de heparina e o lavado foi centrifugado a 300 g por 10 minutos. As células foram então contadas e plaqueadas em meio *Dulbecco's Modified Essential Medium* (D-MEM/F-12) (Gibco Laboratories) suplementado com 25 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine- N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma Chemical) pH 7.4, 2 mM de glutamina, 25 µg/mL de gentamicina (Gibco Laboratories), 2,0 g/L de bicarbonato de sódio e 10% SFB. As células foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 4h, em seguida foram lavadas 3 x com tampão fosfato (PBS) e meio novo foi adicionado.

As células de glândula salivar de *Aedes albopictus* C636 (ATCC:CRL-1660™) foram cultivadas em meio *Leibovitz's L-15 Medium* (L-15) (Gibco Invitrogen Corporation), suplementado com 5% de SFB, 25 µg/mL de gentamicina e 2% de solução 13% de Triptose (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) e incubadas a 27°C.

As células de neuroblastoma murino (N2A, ATCC:CCL-131) foram cultivadas em meio *Minimum Essential Medium* (Gibco Invitrogen Corporation) suplementado com 10% de SFB, 25 µg/mL de gentamicina e 1x de solução de aminoácidos não-essenciais (Gibco, Invitrogen Corporation).

As células de glioma de ratos (C6, ATCC:CCL107) foram cultivadas no mesmo meio em que as células N2A, porém, sem a adição de solução de aminoácidos não-essenciais.

3.2 Cepas virais

Os estoques virais utilizados no presente trabalho foram preparados em células C636 e purificados em gradientes de sacarose conforme descrito por Gould et al. (1985). Resumidamente, o sobrenadante de células C636 infectadas é precipitado com 7% de polietilenoglicol (PEG) 8.000 e 2,3% de NaCl, livres de RNase, por no mínimo 3 h a 4°C sob agitação constante. A solução é então centrifugada a 10.000 rpm, por 30 minutos a 4°C. O precipitado é ressuspenso em tampão STE, e carregado em um tubo contendo sacarose 60% (3mL) e 30% (4mL). A amostra é então centrifugada a 270.000 *g* por 2 h a 10°C, para purificar e concentrar as partículas virais, as quais formam uma banda entre as camadas de sacarose. O vírus purificado é então, titulado, alíquotado e armazenado a -70°C até sua utilização.

Os títulos virais foram determinados através da técnica da formação de focos de infecção em células C636 (ffu_{C636}), como descrito por Dèspres et al. (1993). Brevemente, uma monocamada de células C636 foi infectada com diferentes diluições do vírus a ser titulado. Após 1h de incubação o meio de infecção foi trocado por uma mistura 1:1 (v/v) do meio de cultivo de células C636 (descrito acima) contendo 10% de SFB, mais uma solução de carboximetilcelulose (32%; Sigma) e as placas são incubadas por 10 dias até sua revelação. Para tal, as células são lavadas com tampão PBS, fixadas e permeabilizadas com paraformaldeído 3% e triton X-100 0,5%, respectivamente. A imunomarcagem foi realizada após incubação com anticorpo policlonal anti-dengue (gentilmente cedido pelo Dr. Phillipe Dèspres) e anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase e a

revelação realizada pela adição de NBT (*nitro-blue tetrazolium chloride*) + BCIP (*5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*) (Promega®).

O vírus dengue sorotipo-1 FGA/89 (GenBank AF226687), isolado de um paciente com febre de dengue na Guiana Francesa em 1989, bem como, sua variante neuroadaptada FGA/NA a5c, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Philippe Desprès, da *Unité des Interactions Moléculaires Flavivirus-Hôtes* do Instituto Pasteur, Paris, França. O isolado BR/01-MR (GenBank AF513110) representa um isolado brasileiro recente de vírus dengue sorotipo-1, obtido de um paciente com febre da dengue no ano de 2001 no Paraná (CONEP: 264-05).

3.3 Experimentos de neuropatogênese *in vivo*

A caracterização biológica das cepas FGA/89, FGA/NA a5c e BR/01-MR (utilizada como controle externo) foi realizada através da inoculação intracerebral em camundongos suíços recém-nascidos (RN; até 48h de vida) com 8.000 ffu_{C636} de cada uma das cepas virais (em volume de 40µL). Os sinais de encefalite e a mortalidade foram verificados por 21 dias após a infecção (dpi). Visando avaliar a cinética de infecção, grupos de 30 animais foram infectados com 8.000 ffu_{C636} com cada uma das cepas virais. Nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 30 e 60 pós-infecção, dois animais de cada grupo foram sacrificados e o encéfalo (cérebro, cerebelo e tronco) recolhido para análise. O tecido dos animais foi macerado e homogeneizado, e 30 mg foram utilizados para extração de RNA utilizando o Kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN), conforme descrito pelo fabricante. Adicionalmente foi preparada uma suspensão de 10% do encéfalo dos animais em meio L-15 suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, filtrada em membrana de 0,22 µm. A suspensão foi utilizada para determinação da progênie viral (titulação em células C636) no SNC dos animais infectados com as diferentes cepas virais.

Todos os experimentos com animais foram autorizados pelos comitês de ética em pesquisas com animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA/UFPR 23075.002348/2007-14) e da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ, número 264/05).

3.4 Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR)

A determinação da carga viral no SNC dos animais infectados com as diferentes cepas virais foi realizada por qRT-PCR conforme descrito por Poersch et al. (2005). A normalização dos resultados foi realizada por qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa) do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase murino (*Gapdh*). O RNA total obtido do SNC dos animais foi transcrito reversamente utilizando-se a enzima *ImProm II RT* (Promega) e iniciadores oligo-dT (20 µM) seguindo-se as instruções do fabricante. A reação de qPCR foi realizada com os iniciadores específicos murGAPDH.F 5' - CGACTTCAACAGCAACTCCCCTC – 3' e murGAPDH.R 5' - CACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC – 3', utilizando-se SYBR Green MASTER Mix (Applied Biosystems) em um *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystem). Os ciclos utilizados foram: 50°C por 2 min., 96°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 96°C por 15 seg. e 62°C por 1 min. Curvas de dissociação foram utilizadas para se verificar a especificidade do produto.

3.5 Caracterização *in vitro* das cepas virais em culturas primárias

As cepas virais FGA/89, FGA/NA a5c e BR/01-MR foram caracterizadas *in vitro* pela infecção de células NP e MPC em placas Lab-Tek™ de 8 orifícios (1.0 x 10⁵ células/orifício) com multiplicidades de infecção (MOI) de 10, 40 e 100, além de *mock* (controle negativo), em duplicata. Após 90 minutos de infecção, os inóculos foram removidos, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) 1x e meio novo foi adicionado. Após 24h de incubação a 37°C e 5% de CO₂ a infecção foi analisada. Uma das amostras foi analisada por imunofluorescência indireta (IFI) utilizando anticorpos policlonais anti-dengue sorotipo 1 e segundo anticorpo anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína produzido em cabra (Promega, Madison WI). Da segunda amostra de células infectadas foi extraído o RNA viral com o Kit *QIAgen Viral RNA Mini Kit* conforme descrito pelo fabricante e o

RNA viral determinado conforme descrito no item 3.4. Finalmente, os sobrenadantes virais foram utilizados para se determinar a quantidade de partículas virais infectivas, pela titulação em células C636 conforme descrito no item 3.2.

Os dados obtidos nos experimentos de infecção celular (três experimentos independentes) foram comparados pelo teste de Fisher com valor de $p < 0.05$ sendo considerado como estatisticamente significativo.

3.6 Histopatologia e Imunohistoquímica

Camundongos suíços infectados com os diferentes isolados de dengue foram sacrificados e o encéfalo foi retirado e incubado com solução de fixação (formalina 10%). As amostras fixadas de tecido foram emblocadas em parafina, seccionadas com micrótomo e coradas com solução de hematoxilina/eosina. Para realização das análises de imunohistoquímica as amostras fixadas foram incubadas com anticorpo monoclonal flavivirus específico 4G2 diluído (1:100 em PBS) e com anticorpo secundário de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase em polímero de dextran (Envision⁺/Peroxidase, DakoCytomation[®]). A revelação da reação foi feita utilizando-se o *Liquid DAB* (DaKoCytomation[®]), e a recuperação do antígeno com o *ImmunoRetriever Bio SB[®] Kit*.

3.7 Caracterização Molecular da Amostra Neuroadaptada

O RNA viral da amostra FGA/NA a5c foi extraído com o kit *QIAGEN Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN) conforme descrito pelo fabricante, a partir de amostras de vírus purificados em gradiente de sacarose. Iniciadores específicos foram utilizados para sintetizar DNAs complementares (cDNA) sobrepostos utilizando-se o kit *ImProm II Reverse Transscriptase* (Promega[®]) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, 5 μ L do RNA total mais 1 μ L de iniciadores específicos (5 pmol/ μ L) foram aquecidos a 70°C por 5 minutos. Após esta incubação as amostras

foram resfriadas em gelo, e foi adicionado 4 μL do tampão da enzima (conc. final 1x), 2,7 μL de uma solução de deoxinucleotídeos (dNTPs: dATP, dUTP, dCTP, dGTP – 2,5 mM), 0,5 μL de inibidor de RNase (40 U/ μL , RNaseOUT, Invitrogen), 1 μL da transcriptase reversa *ImProm II Reverse Transcriptase* (5 U/ μL , Promega®) e água ultrapura tratada com DEPC q.s.p. para 20 μL . Em seguida, a reação foi incubada a 25 °C por 5 min. e a 50 °C por uma hora.

O seqüenciamento genômico completo foi realizado a partir de produtos de PCR sobrepostos utilizando-se o kit *TripleMaster PCR System* (Eppendorf®). Brevemente, 5 μL de cDNA, 2,7 μL de uma solução de 2,5 mM de dNTPs, 2 μL de tampão comercial de reação (10x, *HighFidelity buffer* contendo Mg^{2+}), 2 μL (5 pmol/ μL) de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,3 μL da enzima Triple Master (5 U/ μL) e água ultrapura para volume final de 20 μL . A PCR foi submetida aos seguintes ciclos de temperatura: 1 ciclo de 94°C por 3 min. seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg.; 45-55°C por 30 seg. e 68°C por 2-3 minutos, de acordo com o tamanho do amplicon esperado. Alíquotas das amostras de DNA amplificadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídeo. Os amplicons correspondentes às regiões genômicas determinadas foram purificados utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen®) de acordo com o protocolo do fabricante. O seqüenciamento nucleotídico foi realizado utilizando-se o kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) em um equipamento ABI 3100 (Applied Biosystems). As seqüências nucleotídicas foram analisadas com o pacote de softwares Phred/Phrap/Consed (www.phrap.org).

Para estudos comparativos, as seqüências nucleotídicas completas dos vírus FGA/89 (GenBank AF226687), FGA/NA d1d (GenBank AF226686) e BR/01-MR (GenBank AF513110) foram obtidas no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nih.gov>). O software CLUSTALw (THOMPSON et al., 1994, 1997) foi utilizado para realizar o alinhamento das seqüências, e o software MegAlign (DNASTAR Inc.) foi utilizado para quantificar as diferenças nucleotídicas e aminoácídicas entre as cepas virais.

3.8 Mapeamento Tridimensional

A sequência do protótipo FGA/89 foi modelada na estrutura tridimensional usando o *Swiss-model server* (<http://swissmodel.expasy.org/>). A estrutura da helicase do vírus dengue sorotipo 2 (XU et al., 2005) foi selecionada como a estrutura mais similar, e todas as análises tridimensionais foram realizadas com base nesta estrutura utilizando-se o *PyMol* software (DELANO & BROMBERG, 2004).

3.9 Experimentos de Avaliação da Expressão Gênica

Um grupo de seis ninhadas de camundongos do tipo suíço foi misturado ao acaso, e dividido em três grupos contendo 30 recém-nascidos (com até 48h de vida), cada qual com duas fêmeas para alimentação da ninhada. Cada animal recém-nascido foi inoculado com 8.000 ffu_{C636} das amostras, parental (FGA/89), neurovirulenta (FGA/NA a5c) e *mock* (controle negativo, sem vírus). O *mock* foi obtido através de sobrenadantes de células C636 não infectadas, cultivadas por 5-7 dias. O sobrenadante foi submetido ao mesmo processo de obtenção de vírus em gradiente de sacarose, isto é, precipitação com PEG e NaCl, e purificação em gradiente de sacarose. As alíquotas obtidas foram também armazenadas a -70°C até sua utilização. Nos dias 5, 6, 7 e 8 pós-infecção (dpi) cinco animais de cada grupo foram sacrificados em câmara de CO₂ e o encéfalo retirado. O tecido foi então, macerado e homogeneizado, e dividido em várias alíquotas. Três alíquotas de 50 mg foram lisadas com solução de lise I (7M de uréia, 2M de tiouréia, 4% de Chaps, 40mM sw Tris Base, q.s.p. para 40 mL) para análise futura por técnicas de proteômica. Uma alíquota (30 mg) foi utilizada para extração de RNA com o kit *RNeasy[®] Mini Kit* (QIAGEN). O RNA obtido do encéfalo dos animais infectados foi amplificado *in vitro* utilizando-se o kit *Amino Allyl MessageAmp RNA Amplification kit* (Ambion Inc., Austin, TX, USA) seguindo-se as instruções descritas pelo fabricante. Uma alíquota adicional (50 mg) foi utilizada para preparação de uma suspensão

10% do encéfalo conforme descrito acima (item 3.3) para titulação em células C636, e as demais foram armazenadas a -80°C para utilização em experimentos futuros.

As lâminas de microarranjo utilizadas foram produzidas na Virginia Commonwealth University (E.U.A.), e contém 38.476 sondas MEEBO (*mouse exonic evidence-based oligonucleotide*) de 70-mer. No total, 35.302 sondas para alvos gênicos murinos e 3.482 sondas para controles estão representados no microarranjo. A quantidade e a qualidade do RNA amplificado (aRNA) foram avaliadas por espectrofotometria a 260/280 nm. Antes da hibridação do RNA nas lâminas, as mesmas foram re-hidratadas com uma solução de 3x SSC/0,2% de dodecyl sulfato de sódio (SDS) e ligadas covalentemente com 65 mJ sob luz ultravioleta. As lâminas de microarranjo foram lavadas com água destilada e etanol 95% e, então, bloqueadas com uma solução de anidrido succínico. Este pré-tratamento das lâminas bloqueia as aminas livres, o que acarreta uma redução do ruído de fundo e proporciona uma melhor distribuição do DNA sobre a superfície do *spot* (local da lâmina onde foi depositada a sonda).

Para os experimentos de microarranjo, 3 μg do aRNA previamente amplificado foram transcritos reversamente com 2 nmol de hexâmeros randômicos (Invitrogen), 25 nmol de cada dNTP, 2 μL de transcriptase reversa (ImProm-II™ Reverse Transcriptase/Promega) e 60 U de RNase OUT™ (Invitrogen) a 42°C por 2h. O RNA foi então denaturado com uma solução de NaOH (0,03 N) e o pH da solução corrigido com HCl (0,03 N). A síntese da segunda fita de DNA foi realizada a 37°C por 2 h utilizando-se 20 μL de uma solução iniciadores randômicos (0.09 DO_{260} unidades/ μL , Invitrogen) e 0,8 U de polimerase do tipo Klenow (BioPrime DNA Labeling System Kit), 6 nmol de dATPs, dGTPs e dTTPs, 3 nmol de dCTPs e 2 nmol de dCTP-Cy3 ou dCTP-Cy5. Finalmente as amostras foram lavadas duas vezes com água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato) usando-se colunas do tipo Microcon 30 (Amicon) e diluídas em solução de hibridação (5x SSC, 4,2x de solução Denhardt's, 0,21 mg/mL de ssDNA, 0,42% de SDS e 42% de formamida) em um volume final de 120 μL . As amostras foram denaturadas por calor (94°C por 5 min) e acopladas na estação de hibridação GeneTAC Hybstation (PerkinElmer) para hibridação por 16h a 42°C . Os microarranjos foram lavados 2x por 5 minutos com solução contendo 0,1% de SDS e 0,5x SSC, e mais 2x com uma solução 0,06x SSC. A secagem das lâminas foi realizada através de centrifugação à 20°C , 1.000 g e 5

min. As hibridações realizadas entre as amostras controle e infectadas com as cepas FGA/89 e FGA/NA a5c encontram-se representadas na Figura 3.1.

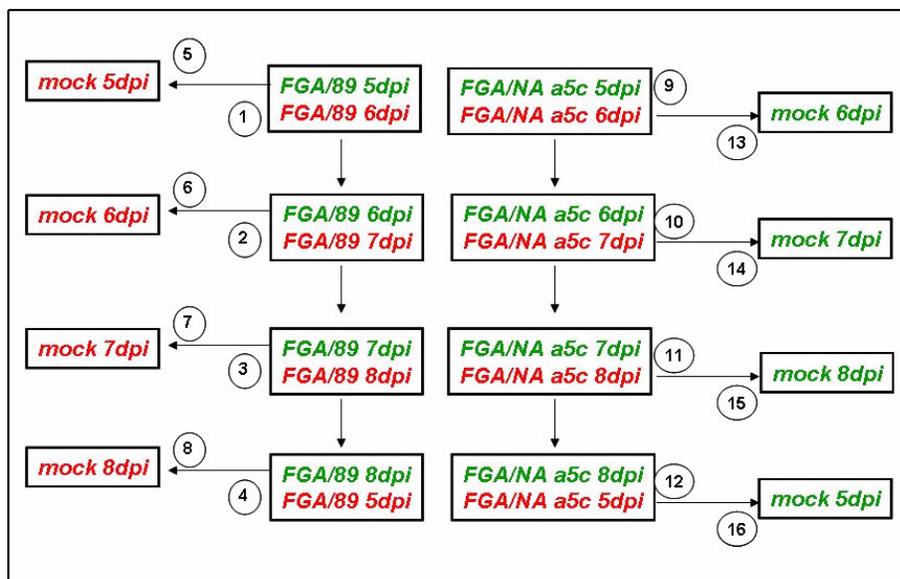


Figura 3.1: Representação esquemática das hibridações das amostras nos microarranjos. Lâminas de microarranjo *Mus musculus biochip* produzidos na *Virginia Commonwealth University*, EUA, hibridadas com amostras do SNC de camundongos infectadas com as cepas FG/89, FG/NA a5c e *mock*. Em verde observam-se as amostras marcadas com o Cy3 e, em vermelho amostras marcadas com o corante Cy5.

Após a secagem das lâminas, as mesmas foram submetidas à detecção de fluorescência pelo sistema *Affymetrix 428 Array Scanner*. Os sinais são obtidos pela medida da intensidade de fluorescência gerada e captada no canal verde, pela excitação do fluoróforo Cy3™ a 532 nm, e no canal vermelho, pela excitação do fluoróforo Cy5™ a 635 nm, que é feita pela incidência de um feixe de raio laser com comprimento de onda de excitação adequado e capturado opticamente. A faixa de regulagem do fotomultiplicador (PMT) variou entre 55% e 65%, de acordo com o fluoróforo e a intensidade geral da marcação de cada sonda. A partir destes sinais são criadas imagens de 16-bits em formato TIFF (*tag image file format*). Cada uma destas imagens representa a leitura dos sinais obtidos em um dos dois comprimentos de onda utilizados. A análise das imagens obtidas pela leitura dos sinais foi realizada pelo software Spot (BEARE & BUCKLEY, 2004).

3.9.1 Análises de bioinformática

As imagens geradas pela leitura do microarranjo foram analisadas pelo software Spot (BEARE & BUCKLEY, 2004). A correção do ruído de fundo e a normalização foram realizadas com o auxílio do software Limma (SMYTH, 2004). A expressão diferencial entre DENV-1 (FGA/89 e FGA/NA a5c) e Mock foi analisada utilizando-se o software SAM (TUSHER, TIBSHIRANI e CHU, 2001) e definindo-se como limiares para seleção de expressão diferencial um FDR (*false discovery rate*) de 1% e modulação de duas vezes. Objetivando aumentar a estringência das análises de expressão diferencial, as amostras coletadas em diferentes dias foram consideradas réplicas biológicas. Deste modo, perde-se a habilidade de se selecionar diferenças ponto-específicas, porém aumenta-se a confiabilidade dos genes modulados durante a infecção do tecido nervoso com o DENV-1. Adicionalmente, a comparação entre as cepas FGA/89 e FGA/NA a5c foram feitas, utilizando-se um critério de modulação de duas vezes, mas com um FDR mais alto, de 30%, devido à maior complexidade dessa comparação. O objetivo desta análise foi identificar genes diferencialmente modulados na infecção entre as cepas: parental e neurovirulenta.

Os genes selecionados nos experimentos de microarranjo, comparando-se os animais infectados com mock versus FGA/89 e mock versus FGA/NA a5c, foram analisados pelo software Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity System, Redwood City, CA, USA, www.ingenuity.com). O *Ingenuity Pathways Analysis Knowledge Base* é uma base de dados curados, construídos com base em evidências científicas obtidas de centenas de milhares de artigos científicos, livros-texto e outras fontes. A lista contendo os genes modulados durante a infecção com ambas as cepas de DENV-1 foi analisada com o auxílio do software IPA, visando definir quais as principais vias de sinalização celular, e metabólicas induzidas no SNC murino pela infecção com DENV-1. A significância (p) da associação entre os dados de microarranjo e as vias canônicas foi mensurada, comparando-se o número de genes presentes nos dados de microarranjo participando de uma via canônica, relativamente ao número total de genes em todas as vias anotadas, armazenados no banco de dados do IPA software. O teste exato de Fisher foi utilizado para

calcular o valor de p , e para determinar a probabilidade que a associação entre os genes e a via possa ocorrer por acaso.

3.10 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR)

Para confirmação dos dados de modulação da expressão gênica obtidos pelos experimentos de microarranjo de DNA, foram desenhados iniciadores específicos para 29 genes. A quantidade de 4 μg de RNA total foi transcrito reversamente utilizando-se o kit *ImProm II Reverse Transcriptase* (Promega®), conforme descrito anteriormente, excetuando o iniciador utilizado, neste caso o oligo-dT (20 μM). Após o término da reação as amostras foram purificadas e concentradas em coluna de Microcon 30 (Millipore) para uma concentração final de 4 $\text{ng}/\mu\text{L}$. As amostras foram aliquotadas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de sua utilização. A reação de qPCR foi realizada com os iniciadores específicos (4 pmol por reação) para cada um dos genes-alvo (Tabela 3.1), utilizando-se *SYBR Green MASTER Mix* (Applied Biosystems) em um *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystem) ou em um *ABI PRISM 7500 Detection System* (Applied Biosystem). A ciclagem utilizada foi: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min., $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min., seguidos de 40 ciclos de $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 seg. e etapa hibridação variando entre $60\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 seg. (Tabela 3.1) e extensão a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min. Curvas de dissociação foram utilizadas para se verificar a especificidade do produto.

O gene normalizador *Gapdh* foi utilizado para corrigir os valores de mRNA para cada um dos genes testados conforme descrito no item 3.4. A normalização foi realizada dividindo o valor obtido por qPCR para o gene X em determinado tempo, pelo valor do gene *Gapdh* no mesmo tempo. A modulação da expressão dos genes nos animais infectados foi definida como: a razão entre o valor do gene X (já normalizado) em determinado tempo (5, 6, 7 e 8 dpi), dividido pelo valor do controle *mock* (controle negativo), no mesmo tempo. Desta forma se obtém o valor da modulação na expressão de um dado gene por qPCR, nos animais infectados. Esta fórmula foi utilizada para obter o valor da modulação da expressão dos 28 genes quantificados por qPCR (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para a amplificação de genes murinos, modulados durante a infecção por DENV-1 no SNC.

Gene	Entrez GeneID	Iniciador <i>Foward</i>	Iniciador <i>Reverse</i>	Temperatura de anelamento	Tamanho do amplicon (pb)
Irf1	16362	TGTGTCGTCAGCAGCAGTCTCT	GTCTTCGGCTATCTTCCCTTCT	60°C	153 pb
Irf7	54123	GCCAGGAGCAAGACCGTGTT	TGCCCCACCACTGCCTGTA	60°C	166 pb
Stat1	20846	GAACGCGCTCTGCTCAA	TGCGAATAATATCTGGGAAAGTAA	60°C	190 pb
Ifit3	15959	CTGAAGGGGAGCGATTGATT	AACGGCACATGACCAAAGAGTAGA	60°C	182 pb
Oas1b	23961	TTCTACGCCAATCTCATCAGTG	GGTCCCCCAGCTTCTCCTTAC	60°C	172 pb
Mx1	17857	AACCCTGCTACCTTTCAA	AAGCATCGTTTTCTCTATTTT	60°C	183 pb
Gbp4	17472	TGGGGGACACAGGCTCTACA	GCCTGCAGGATGGAAGTCTCAA	65°C	144 pb
Tap1	21354	GTGGCCGAGTGGGACAAGAG	AGGGCACTGGTGGCATCATC	60°C	278 pb
Tap2	21355	GGCGGCCTGTGCAGACGACTT	AGCTAACTGGCCCCCTTTTTT	60°C	82 pb
Psmb8	16913	TGATGCTGCAGTACCGGGGGATGG	TAGCTCTGCGGCCAAGGTCGTAGG	60°C	222 pb
Psmb9	16912	GGCTGGGACCAATGTGAGG	CCGATGGTAAAGGGCTGTC	60°C	77 pb
H2-Ea	14968	GGGCACCATCTTCATCATTCAA	GCCAGGTCACCCAGCACAC	60°C	134 pb
H2-Q8	15019	CCAAGGGCCATGAGCAGAGTTTT	GCCGCCGTCCACGTTTTTCAGGT	60°C	208 pb
H2-K1	14973	TGACCTGGCAGTTGAATGG	GTTGGAGACAGTGGATGGAG	60°C	206 pb
Usp18	24110	CTGCCAACCAGGAAGAC	CAATCACGGCAAAGAGTTCATAGT	60°C	73 pb
Ube1l	74153	TGCCCCAGCCGTCCAGTC	GCACAGCGGGCACCTTCAG	60°C	71 pb
Ube2l6	56791	CGCCATACCTTCGCCAACTG	AGACCATCCTCCCTGACG	60°C	196 pb
H2bf/Cbf	14962	TCGGAAGGAGGTGTACATCAAGAA	GTGCAGAGGAACCGTGGAGTG	60°C	126 bp
C1r	50909	TGGGGACTTCCGCTACATCAC	GACACCGGGGCATTTTTCTCT	60°C	191 pb
Ccl4	20303	CTGACCCTCCCCTTCC	GATCTGTCTGCCTCTTTTG	60°C	137 pb
Ccl5	20304	GTGCCCACGTCAAGGAGTATTTCT	TGGCGGTTCCCTTCGAGTGACAA	60°C	82 pb
Cxcl10	15945	CCGTCATTTTCTGCCTCATCCTG	CTCATTCTCACTGGCCCGTCATC	60°C	112 pb
Cxcl11	56066	GAAGGCTCATAAACGACA	TCATAGCCAAGTAGAACAGT	60°C	258 pb
Ccl12	20293	GTCACGTGCTGTTATAATGTTGTT	CACTTCTCCTTGGGGTTCAG	60°C	152 pb
Icam1	15894	CCAGATGCCGACCCAGGAGAG	TCGACGCCGCTCAGAAGAACC	60°C	273 pb
Cd274	60533	ACTGCCTGCAACACATCCTCCAC	TTCAACGCCACATTTCTCCACATC	60°C	145 pb
Serpina3g	20715	CAGGATGCAGCAGGTGGAAGC	CTGTAGTCGGTGGAGATGGAGAAC	60°C	123 pb
IFN- α^*	15964	GACTCATCTGCTGCTTGAATGCAACCCTCC	GACTCACTCCTTCTCCTCACTCAGTCTTGCC	60°C	294 bp
IFN- β	15977	CGCTGCGTTCCTGCTGTG	GATCTTGAAGTCCGCCCTGTAG	60°C	154 pb
Gapdh**	14433	CGACTTCAACAGCAACTCCCCTC	CACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC	62°C	278 pb

*Fonte: OLSON et al., (2001).

**Protocolo de amplificação sem extensão a 72°C.

Iniciador *Foward* desenhado na região 3' de um éxon gênico, e o iniciador *Reverse* na região 5' do éxon subsequente, de forma a incluir uma região intrônica no produto de amplificação, e garantir que apenas o mRNA para o gene em questão seja amplificado.

4. Resultados

4.1 Caracterização Biológica das Cepas Virais

Os mecanismos genéticos de adaptação viral a novos hospedeiros permanecem pouco conhecidos. Deste modo, visando confirmar o fenótipo de neurovirulência da cepa FGA/NA a5c e determinar as alterações genéticas responsáveis por este fenótipo, foi realizada a inoculação de camundongos suíços recém-nascidos por via intracerebral com os vírus FGA/89 (parental), FGA/NA a5c (neuroadaptado), BR/01-MR (isolado clínico recente de um caso de FD) e *mock* (controle sem vírus). Os animais infectados com a cepa neurovirulenta (FGA/NA a5c) exibiram sinais de encefalite (perda de peso, tremores, paralisia de membros posteriores e dificuldade de marcha) por volta do dia 10 pós-infecção (dpi) e evoluíram para óbito em $13,1 \text{ dpi} \pm 2,2$ (média + desvio padrão). Animais infectados com *mock*, FGA/89 e BR/01-MR não demonstraram sinais de doença neurológica (Figura 4.1A).

Visando avaliar a capacidade replicativa e de produzir partículas virais infectivas das cepas de DENV-1, foi realizada uma cinética de infecção. Camundongos suíços recém-nascidos foram inoculados, por via intracerebral, com 8.000 ffu_{C636} das cepas FGA/89, FGA/NA a5c, BR/01-MR e *mock*. Nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 30 e 60 pós-infecção (dpi) dois animais de cada grupo foram sacrificados utilizando-se câmara de CO₂, e o encéfalo (cérebro + cerebelo + tronco encefálico) foi retirado e armazenado a -70°C. Alíquotas foram utilizadas para realização de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) e titulação viral conforme descrito no item 3.4. Os maiores níveis de replicação e progênie viral foram observados em 9 dpi, precedendo os sinais de encefalite nos animais infectados com a cepa FGA/NA a5c, e ambos foram maiores que os níveis observados nos animais infectados com FGA/89 (3,7 e 19,2 vezes, respectivamente). Os animais infectados com a cepa BR/01-MR e *mock* não demonstraram replicação e progênie viral (Figura 4.1 B e C, resultados repetidos e confirmados).

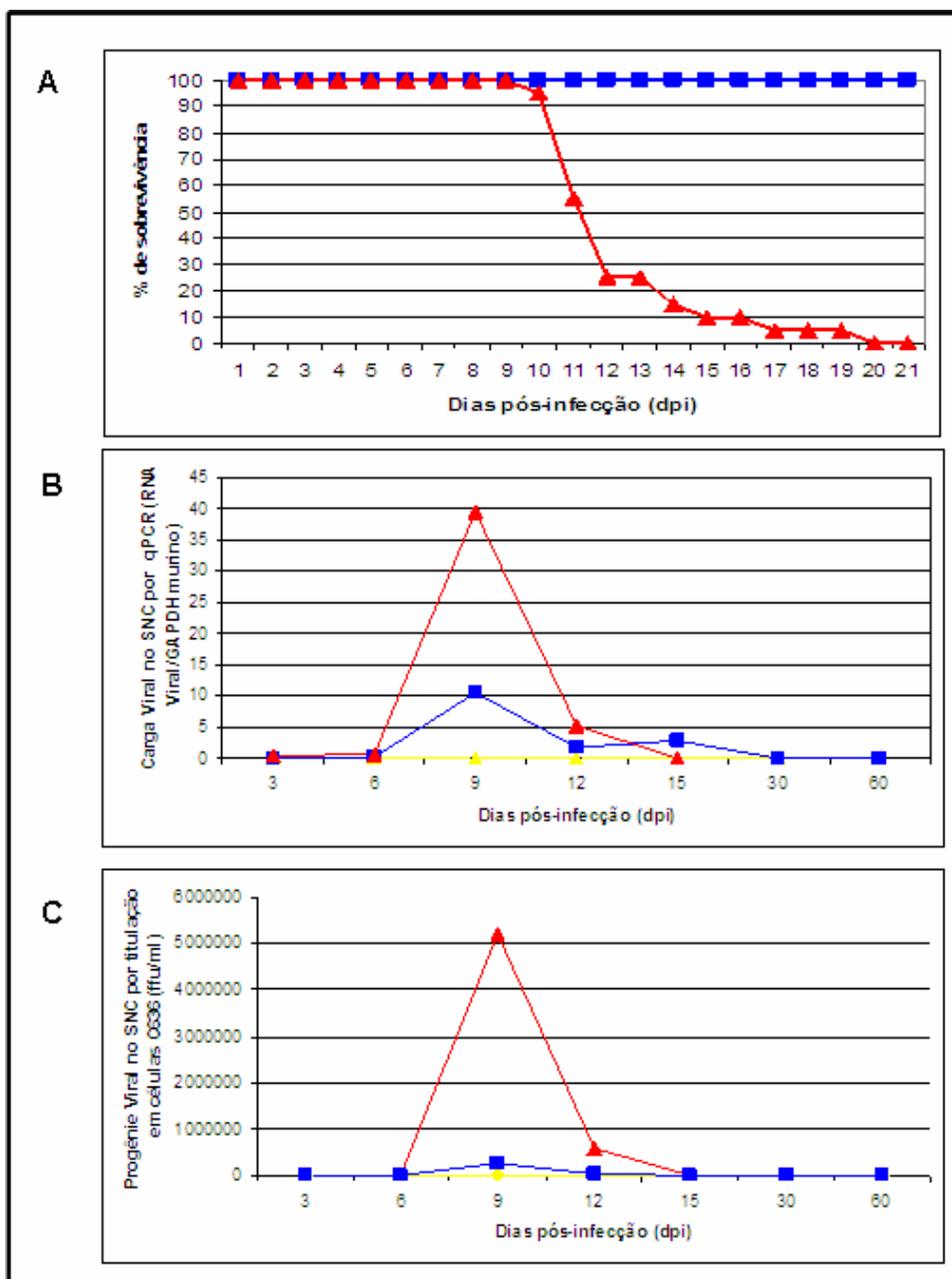


Figura 4.1: Mortalidade, carga e progênie viral no SNC dos animais infectados com as diferentes cepas virais. Sobrevivência de animais infectados com 8.000ff_{U_{C636}} de vírus dengue FGA/89 (azul), FGA/NA a5c (vermelho) e BR/01-MR (amarelo). Carga viral determinada por qRT-PCR (B) e progênie viral determinada por titulação em células C636 (C), no SNC de camundongos infectados com FGA/89, FGA/NA a5c e BR/01-MR, nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 30 e 60 pós-infecção (dpi). Animais infectados com *mock* apresentaram os mesmos valores que os infectados com a cepa BR/01-MR, deste modo os pontos para *mock* e BR/01-MR se sobrepõem nos gráficos, B e C, bem como, os valores para FGA/89, BR/01-MR e *mock* se sobrepõem no gráfico A.

Alguns isolados neuroadaptados de DENV-1 replicam de forma menos eficiente *in vitro* que seus vírus parentais (BRAY et al., 1998). Visando avaliar esta

possível menor habilidade replicativa de vírus neuroadaptados comparado a seus parentais, culturas primárias de neurônios (NP, Figura 4.2) e de macrófagos peritoniais de camundongos suíços (MPC, Figura 4.3), foram infectadas com as cepas virais FGA/89, FGA/NA a5c, BR/01-MR e *mock* (MOI 10, 40 e 100). A replicação (avaliada por qRT-PCR) e a progênie viral (titulação dos sobrenadantes em células C636) foram avaliadas após 24h de infecção. A escolha por culturas primárias representou uma tentativa de utilizar um sistema mais próximo do ciclo viral *in vivo*. As infecções *in vitro* de células MPC com os vírus FGA/89, FGA/NA a5c e BR/01-MR não apresentaram diferenças estatisticamente significantes pelo teste de Fisher utilizando um valor de $p < 0.05$, como estatisticamente significativa. O mesmo foi observado com as infecções de células NP (ver Figura A2.1 e A2.2, Anexo 2). No entanto, não foi possível comparar a carga viral das infecções em células MPC e NP, uma vez que, o gene normalizador *Gapdh* é expresso em maiores níveis em neurônios do que em macrófagos.

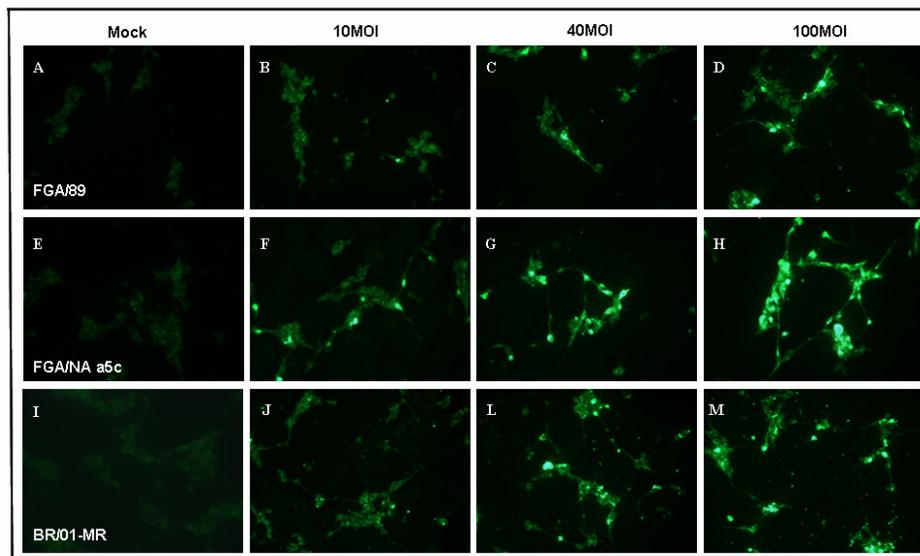


Figura 4.2: Imunofluorescência de células NP infectadas com as diferentes cepas virais. Culturas primárias de neurônios murinos (NP) infectadas com as diferentes cepas virais FGA/89 (B, C e D), FGA/NA a5c (F, G e H), BR/01-MR (J, L e M) e *mock* (A, E e I). As células foram infectadas com MOI de 10 (B, F, e J), MOI de 40 (C, G e L), MOI de 100 (D, H e M) e com o *mock* (A, E e I). Após 24h de infecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpo policlonal anti-dengue e anticorpo anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). As imagens foram feitas em um microscópio NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-Pro® Plus versão 4.5 com aumento de 400x em todas as imagens.

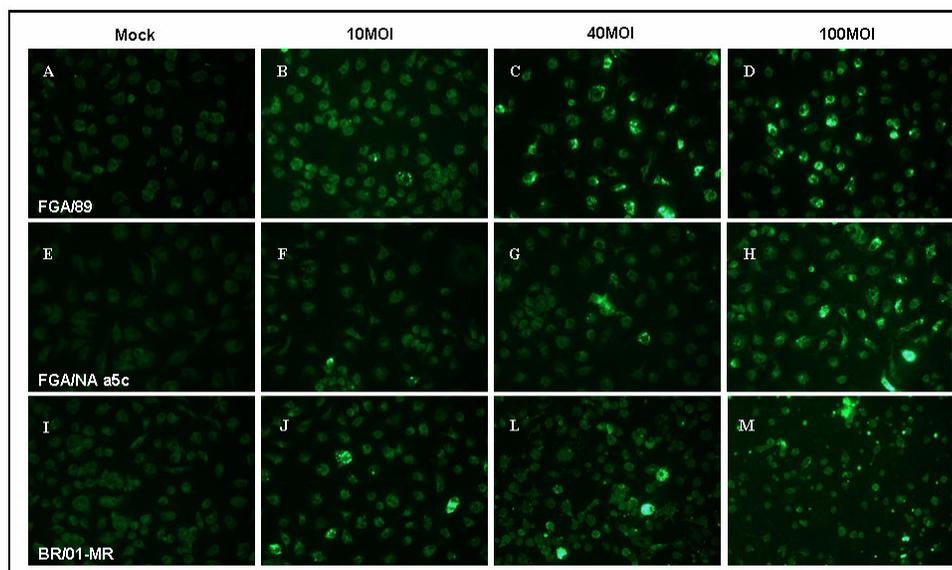


Figura 4.3: Imunofluorescência de células MPC infectadas com as diferentes cepas virais. Culturas de macrófagos peritoniais de camundongos (MPC) infectadas com as diferentes cepas virais FGA/89 (B, C e D), FGA/NA a5c (F, G e H), BR/01-MR (J, L e M) e *mock* (A, E e I). As células foram infectadas com MOI de 10 (B, F, e J), MOI de 40 (C, G e L), MOI de 100 (D, H e M) e com o *mock* (A, E e I). Após 24h de infecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpo policlonal anti-dengue e anticorpo anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). As imagens foram feitas em um microscópio NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-Pro® Plus versão 4.5 com aumento de 400x em todas as imagens.

Imbert et al. (1994) sugeriram que apenas neurônios são susceptíveis a infecção pelo vírus da dengue. Ao contrário, Ramos et al. (1998) demonstraram a presença de antígenos do vírus dengue sorotipo 4, por imunohistoquímica, em um caso fatal de FHD em neurônios, astrócitos, micróglia e células endoteliais. Visando avaliar a susceptibilidade de células gliais à infecção pelo DENV-1, células C6 de glioma de ratos (ATCC:CCL107) e células de neuroblastoma murino (N2A, ATCC:CCL131), foram infectadas com as diferentes cepas virais, em três MOIs diferentes (MOI de 10, 40 e 100). Nossos resultados demonstraram que ambas as células suportam eficientemente a infecção pelo vírus da dengue sorotipo 1 (Figura 4.4 e 4.5). Adicionalmente, conforme demonstrado na Figura 4.2 e 4.3, células NP e MPC de camundongos também se demonstraram susceptíveis à infecção pelo vírus da dengue.

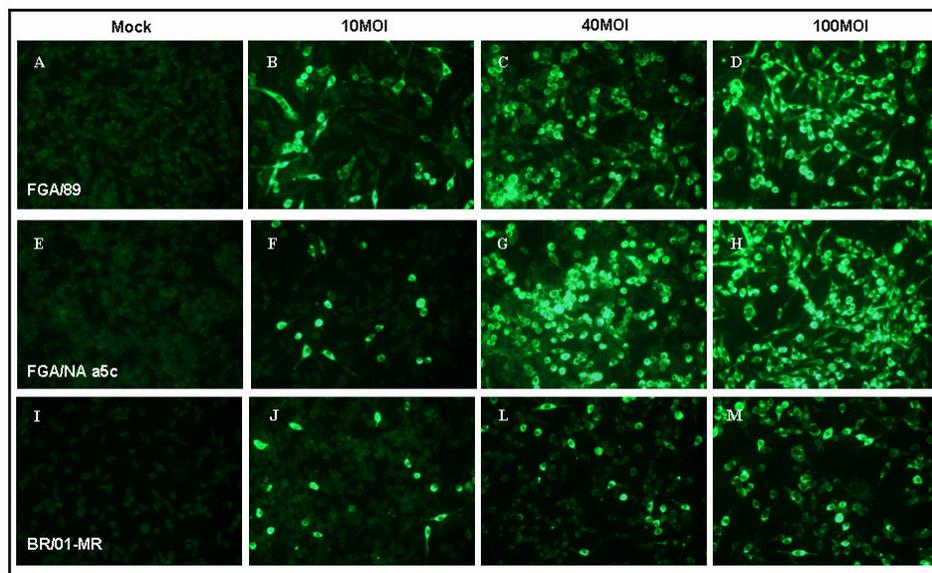


Figura 4.4: Imunofluorescência de células C6 (glioma de ratos) infectadas com as diferentes cepas virais. Culturas de células C6 (glioma de ratos, ATCC:CCL-107) infectadas com as diferentes cepas virais FGA/89 (B, C e D), FGA/NA a5c (F, G e H), BR/01-MR (J, L e M) e *mock* (A, E e I). As células foram infectadas com MOI de 10 (B, F, e J), MOI de 40 (C, G e L), MOI de 100 (D, H e M) e com o *mock* (A, E e I). Após 24h de infecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpo policlonal anti-dengue e anticorpo anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). As imagens foram feitas em um microscópio NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-Pro® Plus versão 4.5 com aumento de 400x em todas as imagens.

Objetivando avaliar o dano induzido no SNC de camundongos pela infecção com as diferentes cepas virais, foram realizadas análises histológicas do tecido nervoso dos animais infectados com as cepas de diferente neurovirulência. Para tanto, secções do SNC dos animais infectados com os vírus FGA/89, FGA/NA a5c, BR/01-MR e *mock* com 10 dpi foram coradas com hematoxilina-eosina (Figura 4.6). Animais infectados com *mock* apresentaram leptomeninges delgadas, formadas por uma única camada de células meningoteliais, além disso, apresentaram o córtex neuronal e o hipocampo bem preservado, com raros neurônios em processo de morte celular, porém, sem sinal de encefalite. Os animais infectados com os vírus FGA/89 e BR/01-MR mostraram leptomeningite linfocítica crônica moderada, com o córtex neuronal e hipocampo bem preservados, sem sinais de inflamação, similar aos animais infectados com *mock*.

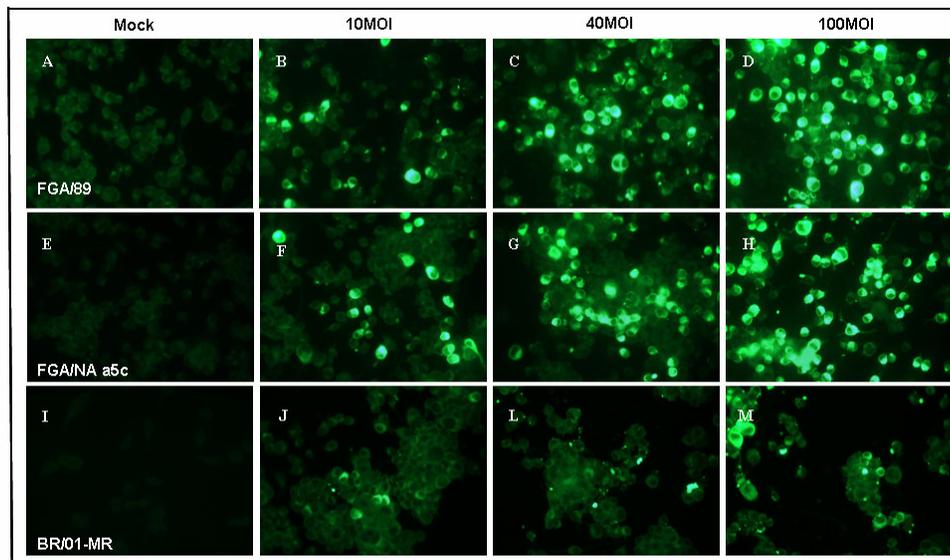


Figura 4.5: Imunofluorescência de células N2A infectadas com as diferentes cepas virais. Culturas de células N2A (neuroblastoma murino, ATCC:CCL-131) infectadas com as diferentes cepas virais FGA/89 (B, C e D), FGA/NA a5c (F, G e H), BR/01-MR (J, L e M) e *mock* (A, E e I). As células foram infectadas com MOI de 10 (B, F, e J), MOI de 40 (C, G e L), MOI de 100 (D, H e M) e com o *mock* (A, E e I). Após 24h de infecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpo policlonal anti-dengue e anticorpo anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). As imagens foram feitas em um microscópio NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-Pro® Plus versão 4.5 com aumento de 400x em todas as imagens.

Os animais infectados com a cepa neurovirulenta FGA/NA a5c apresentaram uma leptomeningite linfohistiocítica crônica intensa e uma moderada encefalite. O córtex neuronal apresentou marcada necrose neuronal (neurônios vermelhos), com processo de satelitose de linfócitos e micróglia envolvendo os neurônios apoptóticos. Adicionalmente observaram-se nódulos microgliais e linfócitos perivasculares (Figura 4.6).

Adicionalmente foram realizadas análises de imunohistoquímica nos cortes histológicos após 10 dpi, utilizando-se o anticorpo monoclonal específico para flavivirus, 4G2. Estas análises tiveram por objetivo determinar quais os principais alvos celulares e locais atingidos pela infecção, uma vez que a infecção de células neuronais pelo vírus da dengue ainda é questão de controvérsia (CLYDE, KYLE e HARRIS, 2006). As análises do córtex temporal demonstraram que as células meningoteliais e a camada acelular (composta por dendritos, axônios e por processos gliais) não são infectadas. Ao contrário, as camadas mais profundas do córtex neuronal mostraram-se infectadas, particularmente os neurônios temporais.

Adicionalmente, observaram-se neurônios infectados no hipocampo, no entanto, não foi detectada infecção na substância branca utilizando-se o anticorpo 4G2. Apesar de não termos observado replicação viral em astrócitos e oligodendrócitos no córtex temporal e hipocampo, não podemos excluir estas células como alvos da infecção pelo vírus da dengue (Figura 4.7 e 4.8).

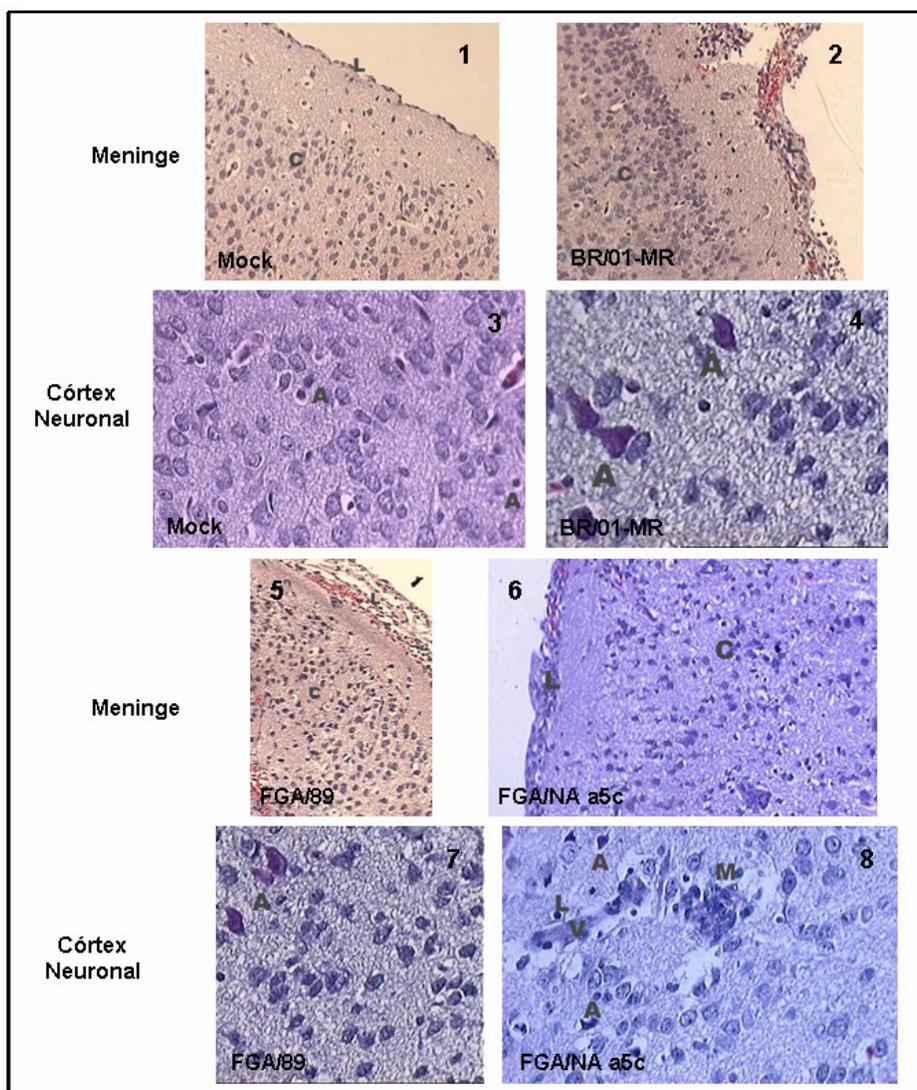


Figura 4.6: Análises histológicas do SNC de camundongos suíços infectados com as diferentes cepas de DENV-1. Análises histopatológicas do SNC de camundongos infectados com *mock*, FGA/89, FGA/NA a5c e BR/01-MR 10 dpi, coradas com hematoxilina-eosina. Meninges e córtex neuronal de: animais infectados com *mock* (1 e 3); BR/01-MR (2 e 4); FGA/89 (5 e 7) e FGA/NA a5c (6 e 8), respectivamente. L: leptomeninges; C: córtex neuronal; A: neurônios apoptóticos; M: nódulos microgliais; L e V: exocitose de linfócitos dos vasos. As imagens produzidas em um microscópio Olympus BX 50 com o software Image-Pro® Plus versão 4.5 (Maryland) com aumentos de 200x (fotos 1, 2, 5 e 6) e 400x (fotos 3, 4, 7 e 8).

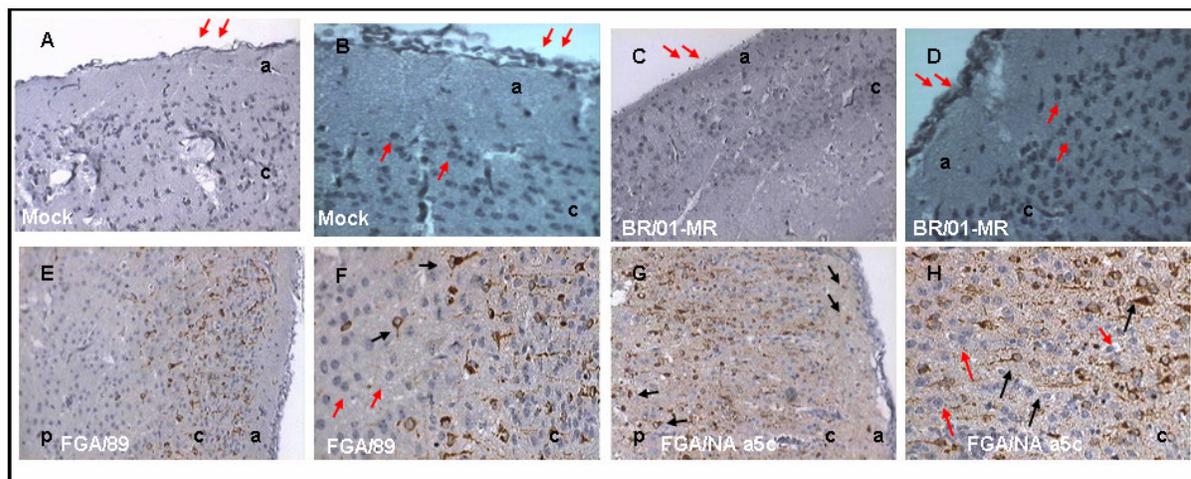


Figura 4.7: Análises de imunohistoquímica do córtex neuronal de camundongos infectados com as diferentes cepas virais com 10 dpi. Células infectadas com *mock* (A e B), BR/01-MR (C e D), FGA/89 (E e F) e FGA/NA a5c (G e H). As células meningeais não são infectadas com nenhuma das cepas virais (setas vermelhas em A, B, C e D). Na seqüência, a camada acelular (a: rica em axônios, dendritos de neurônios e processos de células gliais), também se mostrou negativa à infecção pelo vírus dengue, com exceção da cepa FGA/NA a5c (seta preta em G, a). A camada subsequente do córtex neuronal, mostrou-se a área mais afetada pela infecção com as diferentes cepas de DENV-1 (setas pretas em F e H). Células infectadas não foram observadas nas camadas mais profundas (p, em E) dos animais infectados com a cepa FGA/89, ao contrário do observado na infecção com a cepa FGA/NA a5c (setas pretas em G, p). Apesar da intensa infecção observada no SNC dos animais infectados com a cepa FGA/NA a5c (H), apenas neurônios parecem ser infectados (setas pretas), em contraste ao astrócitos, não infectados (setas vermelhas). Células positivas foram imunomarcadas com anticorpo monoclonal flavivirus-específico 4G2, e anticorpo anti-camundongo IgG conjugado com fosfatase. As imagens foram obtidas em um microscópio Olympus BX 50 com o software Image-Pro[®] versão 4.5 (Maryland) (A, C, E e G foram feitas com aumento de 200x e B, D, F e H com 400x).

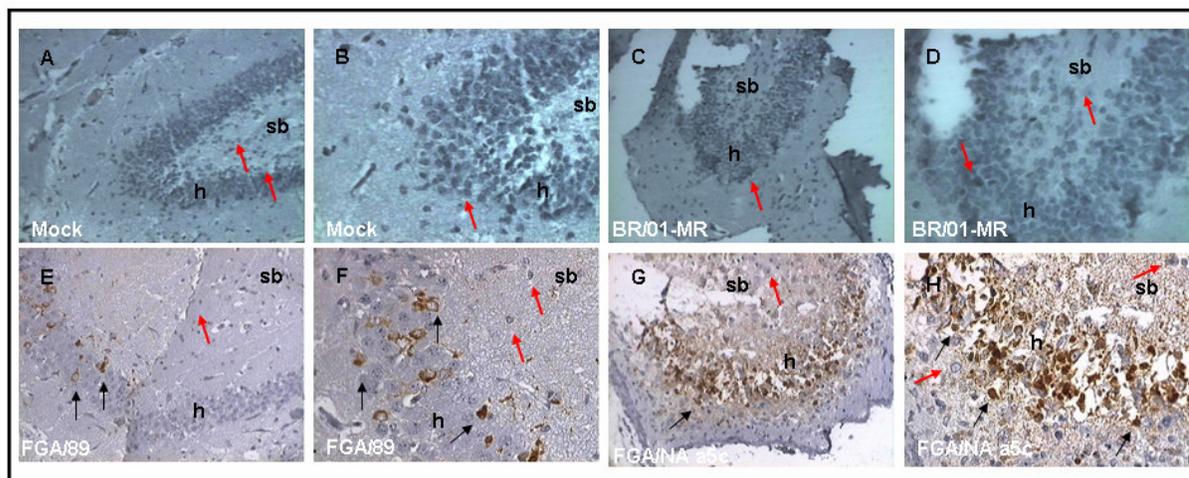


Figura 4.8: Análises de imunohistoquímica do hipocampo de camundongos infectados com as diferentes cepas virais com 10 dpi. Células infectadas com *mock* (A e B), BR/01-MR (C e D), FGA/89 (E e F) e FGA/NA a5c (G e H). Animais infectados com *mock* e a cepa BR/01-MR não apresentaram células infectadas em nenhuma região do hipocampo (setas vermelhas, A-D). Nos quadros E-H, observam-se neurônios hipocampais (h) infectados, em número maior nos animais infectados com a cepa FGA/NA a5c (setas pretas, G e H) em comparação à infecção com FGA/89 (setas pretas, E e F). Não foram observados astrócitos infectados na substância branca e hipocampo, dos animais infectados com as cepas FGA/89 e FGA/NA a5c (setas vermelhas, E-H, sb). Células positivas foram imunomarcadas com anticorpo monoclonal flavivirus-específico 4G2, e anticorpo anti-camundongo IgG conjugado com fosfatase. As imagens foram obtidas em um microscópio Olympus BX 50 com o software Image-Pro[®] versão 4.5 (Maryland) (A, C, E e G foram feitas com aumento de 200x e B, D, F e H com 400x).

Curiosamente, apesar de ter sido demonstrado a susceptibilidade de células gliais de linhagem, como a C6 (glioma de ratos), à infecção pelo vírus da dengue, as análises *in vivo* (por imunohistoquímica, Figura 4.7 e 4.8), revelaram que aparentemente estas células não são alvos da infecção. Este resultado contrasta com os dados de Ramos et al. (1998), que mostram a presença de antígenos virais em astrócitos, micróglia, células endoteliais e em neurônios. Desta forma, estudos mais aprofundados se fazem necessários para definir a susceptibilidade de astrócitos, micróglia e células endoteliais do SNC, à infecção com o vírus da dengue.

4.2 Caracterização Molecular das Cepas Virais

As altas taxas de erro (10^{-3} - 10^{-5} nucleotídeos/ciclo) das polimerases virais durante a replicação do genoma da maior parte dos vírus RNA, acaba por gerar mutações, que podem ter efeito benéfico ou não para o patógeno viral. Um dos principais benefícios dos erros da atividade da polimerase viral é o surgimento de mutações que possam auxiliar o vírus a superar uma pressão seletiva, como por exemplo, o sistema imune e drogas antivirais, ou ainda que possibilite a replicação viral em um novo ambiente celular, inicialmente não permissivo à infecção (DOMINGO & HOLLAND, 1997).

Visando identificar as alterações de aminoácidos potencialmente envolvidas na aquisição do fenótipo de neurovirulência, foi realizado o seqüenciamento nucleotídico completo da cepa neuroadaptada FGA/NA a5c. A comparação da seqüência de aminoácidos com a cepa neuroadaptada FGA/NA d1d (DÈSPRES et al., 1998; DUARTE DOS SANTOS et al., 2000; número de acesso no *GenBank*: AF226686) demonstrou que ambas compartilham apenas as substituições na proteína de envelope (E), Met₁₉₆/Val, e na porção helicase da NS3 Leu₄₃₅/Ser.

As mutações previamente identificadas na proteína de E da cepa FGA/NA d1d nas posições 365 e 405, não foram encontradas na cepa FGA/NA a5c. Adicionalmente, foi identificada uma mutação específica da cepa FGA/NA a5c na posição 276 da proteína E, com a substituição de uma treonina por uma prolina (Tabela 4.1). A seqüência nucleotídica completa da cepa FGA/NA a5c foi depositada no *GenBank* com o número de acesso EF122232. Adicionalmente, foram

identificadas na cepa FGA/NA a5c duas mutações silenciosas na proteína E. As mutações na proteína E correspondem à inversão da seqüência TC em FGA/89 para CT em FGA/NA a5c (posição 2317 e 2318 da proteína E). Apesar das diferenças aminoacídicas encontradas entre as cepas neurovirulentas FGA/NA d1d e a5c, não foram observadas diferenças fenotípicas entre as cepas, quando utilizadas para infecções via intracerebral em camundongos suíços recém-nascidos.

Tabela 4.1: Mutações aminoacídicas entre os vírus neuroadaptados FGA/NA a5c e FGA/NA d1d comparados com a cepa parental FGA/89.

Cepa Viral	Proteína E				NS3
	Domínio II		Domínio III		Domínio Helicase
FGA/89	Met ₁₉₆ ATG	Thr ₂₇₆ ACA	Val ₃₆₅ GTC	Thr ₄₀₅ ACC	Leu ₄₃₅ TTA
FGA/NA d1d	Val ₁₉₆ GTG	Thr ₂₇₆ ACA	Ile ₃₆₅ ATC	Ile ₄₀₅ ATC	Ser ₄₃₅ TCA
FGA/NA a5c	Val ₁₉₆ GTG	Pro ₂₇₆ CCA	Val ₃₆₅ GTC	Thr ₄₀₅ ACC	Ser ₄₃₅ TCA

NOTA: A tabela acima mostra as alterações aminoácídicas da cepa parental FGA/89 quando comparada as suas variantes neurovirulentas FGA/NA d1d e FGA/NA a5c. A identidade de aminoácidos entre FGA/89 e FGA/NA a5c foi de 99.9%. A cepa BR/01-MR é a amostra mais divergente entre as estudadas (identidade entre 97.7 e 97.8%, comparando-a com as cepas: FGA/89, FGA/NA a5c e d1d), desta forma, para facilitar a leitura da tabela, as mutações presentes nesta cepa não foram inseridas na tabela. No entanto, nenhuma das mutações descritas como possivelmente envolvidas na aquisição do fenótipo de neurovirulência estão presentes na cepa BR/01-MR, o que pode explicar seu fenótipo atenuado *in vivo*.

A proteína não-estrutural NS3 é uma proteína multifuncional, acumulando as funções helicase, nucleosídeo 5'-tiosfatase (NTPase) e RNA 5-trifosfatase (RTPase), importantes na replicação viral e na formação do *cap*. Além disso, sua porção amino-terminal (primeiros 180 aminoácidos) tem função de protease viral (BENARROCH et al., 2004).

Objetivando-se mapear a mutação observada na proteína NS3, foi construído em modelo tridimensional por homologia com a estrutura de alta resolução já conhecida para o vírus dengue sorotipo 2 (XU et al., 2005). A mutação não-conservativa observada no domínio helicase da proteína NS3 mapeia no β -hairpin do domínio II (resíduos 327-481), flanqueando o motivo IV da superfamília II das RNA helicases (Figura 4.9). As mutações observadas na proteína de envelope foram mapeadas por Duarte dos Santos et al. (2000).

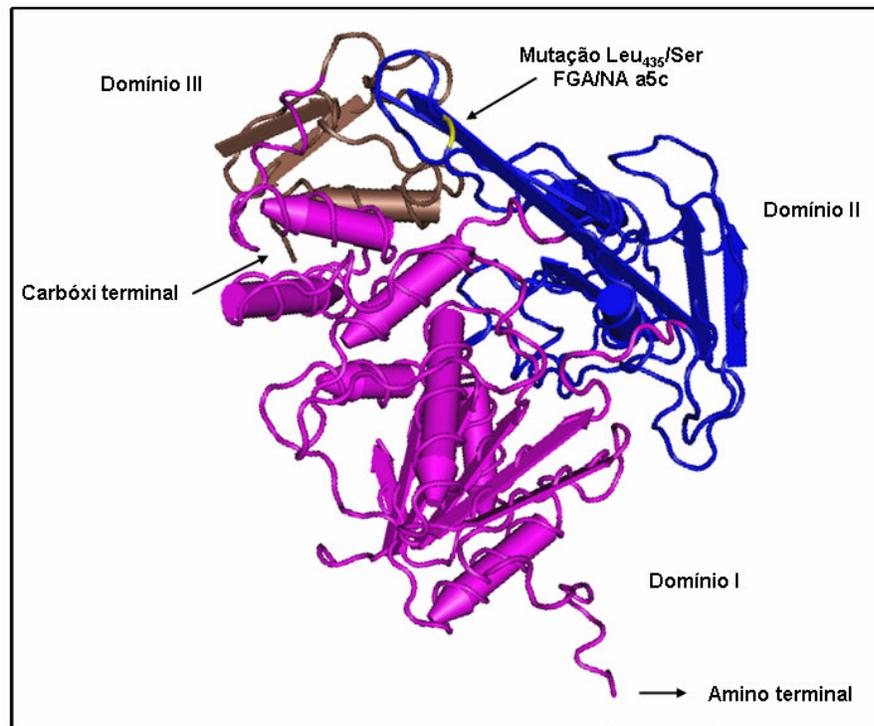


Figura 4.9: Representação esquemática do domínio helicase da proteína NS3 do vírus dengue sorotipo 2. A estrutura do domínio helicase da proteína NS3 do vírus DENV-2, cepa TSV01 (número de acesso no *GenBank*: AY037116), esta representada indicando a localização da mutação Leu₄₃₅/Ser. A seta indica a posição da mutação compartilhada entre os vírus neurovirulentos FGA/NA d1d e a5c (Leu₄₃₅/Ser) em comparação ao parental FGA/89. Estrutura modelada utilizando-se o *Swiss-model server* (<http://swissmodel.expasy.org/>) e o software *PyMol* (DELANO & BROMBERG, 2004). * Porção carboxi-terminal do domínio helicase.

4.3 Experimentos de Genômica Funcional e PCR em Tempo Real

O resultado de uma infecção viral depende de uma complexa rede de interações entre a resposta do hospedeiro e a habilidade do vírus em escapar e/ou suplantar estas respostas. Em infecções virais agudas, as respostas do hospedeiro envolvem ambas, respostas curtas (inatas) e longas (adaptativas). Ambas objetivam eliminar o patógeno viral e/ou reduzir a doença causada pelo mesmo, bem como, prevenir infecções subseqüentes através do mecanismo de memória imunológica. Desta forma, a evolução clínica de um processo infeccioso viral é dependente do balanço entre a resposta do hospedeiro à infecção e a capacidade replicativa do

vírus, o que determina o desenvolvimento ou não da doença (BOURNE et al., 2007; PASIEKA et al., 2006).

Com o objetivo de conhecer o perfil transcricional da resposta tecidual do SNC murino após a infecção pelo DENV-1, foram realizados experimentos de microarranjo de DNA. Uma vez determinado que a máxima replicação viral no SNC ocorra no dia 9 pós-infecção para as cepas FGA/89 e FGA/NA a5c, decidiu-se por analisar a expressão gênica em 5, 6, 7 e 8 dpi. Estes tempos correspondem aos dias que precedem à máxima replicação viral no SNC (conforme Figura 4.1B). Em 5 dpi as taxas de replicação viral para as cepas FGA/89 e FGA/NA a5c são semelhantes, e apenas após o sexto dia pós-infecção ocorre um maior aumento na replicação da cepa neurovirulenta comparado à cepa parental (Figura 4.1B). Três grupos de 30 camundongos suíços recém-nascidos foram infectados com 8.000 ffu_{C636} das cepas FGA/89, FGA/NA a5c e *mock*. Em 5, 6, 7 e 8 dpi, cinco animais de cada grupo foram sacrificados em câmara de CO₂, para retirada do encéfalo, que foi então homogenizado para extração de RNA total. Inicialmente, foi avaliada a replicação viral por qPCR em 5, 6, 7 e 8 dpi. Conforme já descrito anteriormente, na Figura 4.1B, a cepa neurovirulenta FGA/NA a5c apresenta uma maior replicação viral no SNC murino, em comparação à cepa FGA/89 (7,8 x > em 5 dpi; 5,2 x > em 6 dpi; 8,4 x > em 7 dpi e 2,8 x > em 8 dpi; Figura 4.10).

Os microarranjos utilizados neste estudo englobam todo o genoma murino, e as hibridações realizadas entre as amostras estão representadas na Figura 3.1 da seção 3.9 de Materiais e Métodos (ver também figura 4.11). Quando se comparou a diferença na expressão gênica entre os animais infectados com o *mock* e os animais infectados com ambas as cepas de DENV-1 (parental ou neuroadaptada) foi observado a super-expressão de 148 genes (de acordo com os critérios definidos na seção 3.9.2 dos Materiais e Métodos; Tabela 4.2). Os maiores níveis de modulação da expressão gênica foi observado em 8 dpi, que corresponde ao momento de maior replicação viral para ambas as cepas. Este dado sugere que a modulação da expressão gênica está diretamente relacionada aos níveis de replicação viral em um dado momento. Tem sido extensivamente demonstrado nos últimos anos, que a maior severidade da doença por DENV esta relacionada à maior carga viral no soro de pacientes infectados (LIBRATY et al., 2002; VAUGH et al., 2000; PANG, CARDOSA e GUZMAN, 2007).

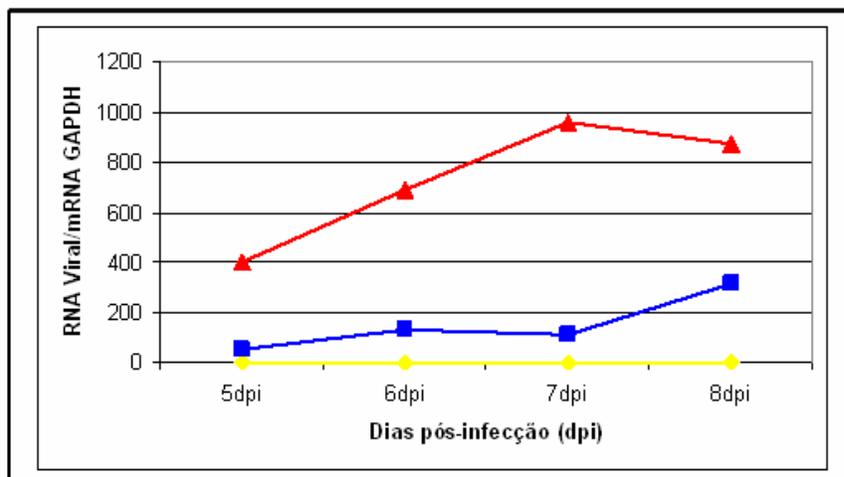


Figura 4.10: Diferença nos níveis de RNA viral no SNC de camundongos infectados com as cepas parental (FGA/89), neurovirulenta (FGA/NA a5c) e *mock* (controle negativo) nos dias 5, 6, 7 e 8 dpi. Estas amostras foram utilizadas para os experimentos de hibridação em microarranjos de DNA. A determinação do RNA viral foi realizada por qRT-PCR e os resultados normalizados com a quantificação do gene murino *Gapdh*, utilizando-se a técnica de qPCR. FGA/NA a5c (vermelho), FGA/89 (azul) e *mock* (amarelo).

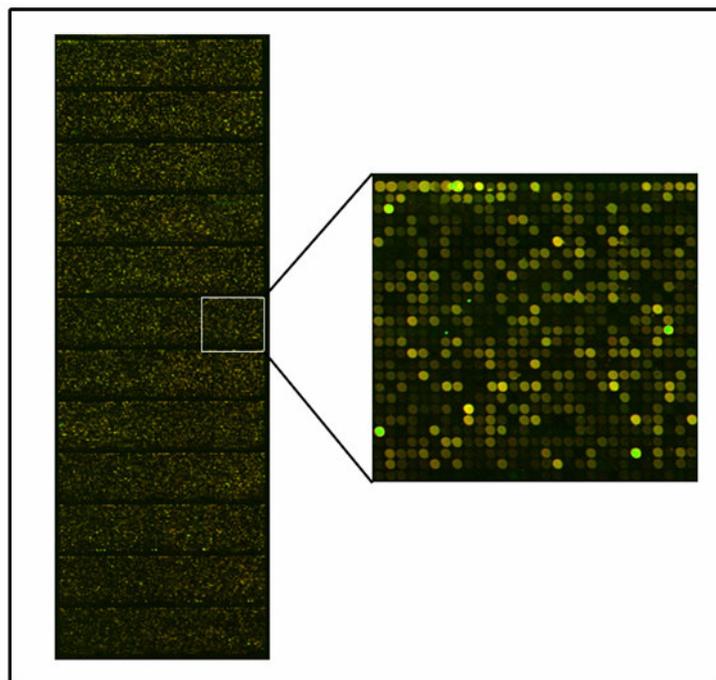


Figura 4.11: Imagem obtida após a hibridação das amostras *mock* 8 dpi (Cy5) e FGA/89 8 dpi (Cy3), lâmina 8 da figura 3.1. Exemplo de imagem obtida nas hibridações das amostras de SNC nos microarranjos murinos utilizados em nosso estudo. Observar a divisão da lâmina em 12 linhas e 4 colunas, totalizando 48 grupos. Cada grupo é subdividido em 29 colunas e 28 linhas, totalizando 38.976 *spots* disponíveis, dos quais 38.476 *spots* estão ocupados com MEEBOs.

Os experimentos de microarranjo de DNA, comparando os animais infectados com as cepas FGA/89 e FGA/NA a5c, aos animais infectados com o *mock*, permitiram selecionar 148 genes, como sendo modulados na infecção com ambas as cepas. Objetivando aumentar a estringência da análise de expressão diferencial, as amostras coletadas nos diferentes dias foram consideradas como réplicas biológicas. Desta forma, perde-se a habilidade de selecionar diferenças ponto-específicas, no entanto, aumenta-se a confiabilidade dos genes selecionados como diferencialmente expressos. Os critérios de seleção para um gene ser considerado como modulado pela infecção foi: um aumento de duas vezes (*fold change* = 2) na expressão (considerando a média dos 4 pontos), comparando-se os animais infectados com o *mock*, e um FDR (do inglês, *False Discovery Rate*) de 1%, o que significa uma chance de 1% de resultados falso-positivos.

Além disso, os 148 genes modulados na infecção com ambas as cepas de DENV-1 mostraram-se superexpressos e não foi detectado nenhum gene com expressão diminuída que tenha atendido ao critério de seleção supracitado. Outros experimentos de microarranjo de DNA utilizando SNC de camundongos, infectados com WNV e vírus rábico, também demonstraram poucos genes com expressão reduzida em comparação com o número de genes superexpressos (UBOL et al., 2006; VENTER et al., 2005).

Tabela 4.2: Genes superexpressos no SNC de camundongos infectados com as cepas FGA/89, FGA/NA a5c e *mock* nos dias 5, 6, 7 e 8 pós-infecção (dpi).

Função Geral	Função Específica	Processo Biológico	Símbolo do Gene	Entrez GeneID	Descrição	FGA/89 x <i>Mock</i>				FGA/NA a5c x <i>Mock</i>					
						5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi		
Resposta Imune	Transcrição	IFN I processo biosintético	Irf9	16391	Interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma	3,54	5,59	4,6	4,87	5,625	6,966	5,998	6,258		
			Irf7	54123	Interferon regulatory factor 7	3,01	5,24	3,9	4,99	8,19	13,9	6,46	11,46		
			Irf8	15900	Interferon regulatory factor 8	2,21	1,88	3,05	8,0	2,72	4,14	3,97	15,09		
			Sinalização via citocina e quimiocina	Stat1	20846	Signal transducer and activator of transcription 1	7,98	16,6	12,6	13,7	21,02	24,0	14,15	21,75	
				Stat2	20847	Signal transducer and activator of transcription 2	1,62	4,78	2,68	5,36	4,0	7,12	4,63	6,78	
				Nmi	64685	N-myc (and Stat1) interactor	2,78	3,47	2,4	3,8	4,31	5,8	5,09	9,88	
			Regulador positivo de IL-12	Irf1	16362	Interferon regulatory factor 1	3,23	2,55	1,79	7,12	3,39	4,92	6,45	24,75	
				Corpúsculos PML	Pml	18854	Promyelocytic leukemia	1,8	2,23	2,1	2,31	3,03	3,73	2,68	5,49
			Endopeptidase		Apresentação de antígeno	Sp100	20684	Nuclear antigen Sp100	3,03	3,38	1,72	2,86	4,49	7,39	4,0
				Psmb8		16913	Proteosome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional protease 7)	3,72	4,86	3,58	7,97	6,0	11,34	8,77	17,55
	Psmb9	16912		Proteosome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional protease 2)		3,96	6,56	2,43	14,3	2,92	20,18	11,36	25,68		
	Transporte	Apresentação de antígeno	Tap1	21354	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	2,99	4,42	2,64	6,59	4,12	9,31	6,01	15,46		
			Tap2	21355	Transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	3,59	2,75	2,84	13,1	3,22	11,11	6,2	18,63		
	Ligação ã antígeno	Apresentação de antígeno	Lilrb4	14728	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4	3,08	1,71	1,18	3,51	1,83	2,53	1,4	17,79		
	Apresentação via MHC classe II	Apresentação de antígeno	H2-Ea	14968	Histocompatibility 2, class II antigen E alpha	1,55	2,97	2,3	4,58	1,9	5,35	4,75	39,2		

		H2-Ab1	14961	Histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	2,64	1,48	1,5	6,14	1,54	3,29	3,13	18,54
		Ctss	13040	Cathepsin S	2,64	2,81	2,98	6,78	2,36	4,4	4,11	8,46
		Cd74	16149	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex class II antigen-associated)	1,84	1,53	1,72	3,191	1,68	3,09	2,06	17,34
Apresentação via MHC classe I	Apresentação de antígeno	H2-Q2	15013	Histocompatibility 2, Q region locus 2	4,38	5,68	2,24	11,2	5,06	3,96	9,3	12,64
		H2-Q8	15019	Histocompatibility 2, Q region locus 8	3,4	3,88	2,47	5,53	5,01	7,48	8,41	11,87
		H2-Q7	15018	Histocompatibility 2, Q region locus 7	2,78	4,53	3,0	5,65	3,37	8,04	6,39	9,82
		H2-Q6	110557	Histocompatibility 2, Q region locus 6	2,81	5,25	3,43	7,32	5,25	5,41	11,47	4,37
		H2-Q5	15016	Histocompatibility 2, Q region locus 5	2,59	1,86	2,05	4,65	6,41	8,44	6,3	15,06
		H2-L	14980	Histocompatibility 2, D region	3,84	5,86	3,49	10,32	5,73	4,91	9,0	8,36
		H2-T9	15051	Histocompatibility 2, T region locus 9	3,86	2,34	2,43	5,07	5,33	11,2	7,89	14,0
		H2-T10	15024	Histocompatibility 2, T region locus 10	5,94	3,65	2,59	6,34	5,01	10,81	13,84	23,9
		H2-T22	15039	Histocompatibility 2, T region locus 22	3,74	2,34	2,12	5,09	5,1	10,03	9,47	16,24
		H2-T23	15040	Histocompatibility 2, T region locus 23	4,33	5,04	2,9	8,77	6,36	10,62	8,91	14,43
		H2-K1	14973	Histocompatibility 2, K1, K region	5,06	6,41	3,69	12,22	6,27	8,65	8,36	14,14
Ligação à GTP	Induzido por IFN	B2m	12010	Beta-2 microglobulin	3,61	4,9	3,5	10,84	4,69	8,06	7,48	14,73
		Gbp1	14468	Guanylate nucleotide binding protein 1	4,41	1,46	1,59	9,57	4,15	6,45	5,65	26,6
		Gbp2	14469	Guanylate nucleotide binding protein 2	7,97	6,7	3,63	27,6	10,32	29,15	21,15	60,14
		Gbp4	17472	Guanylate nucleotide binding protein 4	3,67	7,85	3,58	10,89	4,77	16,22	11,26	28,74
		Gbp5	229898	Guanylate nucleotide binding protein 5	2,96	2,71	2,42	10,04	6,83	9,73	8,88	38,74
		Irgm	15944	Immunity-related GTPase family, M	5,67	8,16	4,47	7,4	9,04	13,13	7,01	20,14
		Gbp6	229900	Guanylate nucleotide binding protein 6	4,39	8,21	3,57	9,92	6,0	19,43	13,42	15,83
		BC057170	236573	cDNA sequence BC057170	3,56	2,49	3,09	7,44	3,49	8,3	8,66	19,68
		Mpa2l	100702	Macrophage activation 2 like	8,89	9,13	8,1	30,3	17,5	38,68	33,55	73,04

Ligação à RNA	Induzido por IFN	Oas1b	23961	2'-5'oligoadenylate synthetase 1B	7,25	11,3	8,79	12,5	17,86	24,07	18,38	26,73
		Oas1g	23960	2'-5'oligoadenylate synthetase 1G	5,69	9,84	6,27	11,95	10,61	24,4	17,17	30,12
		Oasl1	231655	2'-5'oligoadenylate synthetase-like 1	3,84	7,16	2,86	9,03	8,26	17,91	8,27	32,51
		Oasl2	23962	2'-5'oligoadenylate synthetase-like 2	5,91	15,2	10,1	13,7	15,18	22,01	13,78	19,58
		Oas1a	246730	2'-5'oligoadenylate synthetase 1A	2,11	4,33	2,23	4,21	4,94	8,81	4,48	6,54
		Oas2	246728	2'-5'oligoadenylate synthetase 2	2,6	2,94	1,79	5,19	5,25	14,44	5,84	16,29
Ligação à DNA	Induzido por IFN	Sp110	109032	Sp110 nuclear body protein	2,18	3,35	2,22	5,36	3,97	9,18	6,06	17,45
Ligação	Induzido por IFN	lfit1	15957	Interferon-induced protein with tetrcopeptide repeats 1	8,82	23,7	12,4	37,6	31,05	28,25	19,32	31,76
		lfit2	15958	Interferon-induced protein with tetrcopeptide repeats 2	3,28	4,54	4,51	6,53	4,72	9,68	6,66	14,71
		lfit3	15959	Interferon-induced protein with tetrcopeptide repeats 3	15,4	37,0	14,8	49,2	17,44	30,12	18,14	31,74
Helicase	Induzido por IFN I processo biosintético	lfih1	71586	Interferon induce with helicase C domain 1	6,34	9,32	4,73	12,8	16,11	28,8	14,87	34,42
		Dhx58	230073	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	4,0	6,35	4,27	6,43	9,33	12,1	8,81	13,5
		Ddx58		DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	4,0	6,35	4,27	6,43	9,33	12,09	8,81	13,5
Ligação à Proteína	NC	lfi203	15950	Interferon activated gene 203	2,47	2,85	2,56	7,44	4,0	5,21	3,75	14,45
		Pyhin1	236312	Pyrin and HIN domain family, member 1	6,45	1,48	1,93	11,25	5,8	11,45	8,73	27,3
		Bcl2a1a	12044	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	2,32	1,87	2,2	3,91	1,67	3,94	4,15	9,09
NC	NC Apoptose	lfi205	15952	Interferon activated gene 205	5,12	5,45	6,41	25,2	7,1	18,26	12,77	64,0
		Bcl2a1b	12045	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1b	3,09	1,97	1,89	3,15	2,28	4,03	3,14	6,2
		Bcl2a1c	12046	B-cell/leukemia/lymphoma 2 related protein A1c	3,28	1,41	1,75	7,93	3,21	5,55	4,01	23,68
Receptor	Induzido por IFN	lfitm1	68713	Interferon induced transmembrane protein 1	3,09	5,72	2,38	7,59	5,24	4,0	5,52	7,57
		lfitm2	80876	Interferon induced transmembrane protein 2	2,34	4,39	2,25	5,8	4,04	6,41	4,82	7,65
		lfitm3	66141	Interferon induced transmembrane protein 3	4,29	8,23	5,34	14,3	9,15	6,88	12,44	13,81

	Adesão celular	Lgals9	16859	Lectin, galactose binding, soluble 9	2,96	4,83	4,0	6,41	6,09	8,31	7,64	15,85
		Lgals3bp	19039	Lectin, galactosidase-binding, soluble, 3 binding protein	6,98	7,13	7,29	11,4	12,80	20,21	13,13	19,43
		Icam1	15894	Intercellular adhesion molecule 1	1,91	1,52	1,47	3,91	1,43	2,24	3,3	10,04
		Itgb2	16414	Integrin beta-2	1,74	1,51	1,74	3,06	1,46	2,9	2,17	7,75
		Siglec1	20612	Sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	1,44	2,56	3,58	4,46	3,6	8,62	10,52	13,86
	Ativação de células B	Bst2	69550	Bone marrow stromal cell antigen 2	7,58	14,0	8,75	16,8	20,66	15,87	18,3	13,41
	Proliferação celular	Cd274	60533	CD274 antigen	4,87	1,84	1,89	9,12	8,0	9,84	5,79	34,92
	Inibição de citocinas pró-inflamatórias	Il10ra	16154	Interleukin 10 receptor, alpha	1,93	2,79	1,71	3,68	1,62	5,67	3,11	6,04
	NC	Ly6e	17069	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	2,16	3,92	2,3	5,33	3,18	3,07	5,16	5,76
GTPase	Induzido por IFN	Igtp	16145	Interferon gamma induced GTPase	8,15	6,5	5,75	23,9	10,91	19,17	14,01	52,13
		Mx1	17857	Myxovirus (influenza virus) resistance 1	3,14	3,41	2,64	8,64	9,92	20,07	14,0	27,66
		Mx2	17858	Myxovirus (influenza virus) resistance 2	6,89	9,61	8,36	20,0	16,13	44,79	36,36	26,51
		Gvin1	74558	GTPase, very large interferon inducible 1	2,85	4,01	1,61	4,0	6,95	10,01	2,58	9,85
		Igtp2	54396	Interferon inducible GTPase 2	7,43	3,27	3,29	21,0	7,25	18,22	11,6	27,95
		Igtp1	60440	Interferon inducible GTPase 1	16,2	15,5	10,3	66,34	29,22	54,66	56,48	144,7
Transcrição	Induzido por IFN	Ifi204	15951	Interferon activated gene 204	5,5	4,06	6,05	19,7	5,2	16,13	32,22	52,16
Exonuclease	Induzido por IFN	Isg20	57444	Interferon-stimulated protein	1,38	2,31	1,82	4,2	2,35	6,34	4,03	9,9
Quinase	Induzido por IFN	Eif2ak2	19106	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	3,9	7,07	4,36	7,84	8,56	14,03	8,84	12,25
Citocina/Quimiocina	Quimiotaxia	Ccl5	20304	Chemokine (C-C motif) ligand 5	13,1	9,37	7,33	26,9	12,43	31,85	39,79	115,3
		Ccl12	20293	Chemokine (C-C motif) ligand 12	3,97	9,89	6,14	23,0	7,86	24,3	24,0	39,2
		Cxcl10	15945	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2,37	2,47	2,84	20,5	3,57	10,96	15,31	32,42
	Apoptose	Tnfsf10	22035	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	1,47	2,8	1,86	2,91	1,82	4,93	2,75	6,69
Peptidase	Ativação do	Cfb	14962	Histocompatibility 2,	7,52	5,71	6,61	19,7	7,81	15,06	16,55	48,12

		complemento		complement component factor B									
			C2	12263	Complement component 2 (within H2-S)	2,2	2,42	1,9	5,89	2,49	8,06	4,93	9,72
			C1r	50909	Complement component 1, r subcomponent	4,13	1,67	2,32	6,56	3,19	5,25	6,46	27,14
	Inibidor de Peptidase	Ativação do complemento	C4b	12268	Complement component 4B (Chido blood group)	2,28	2,63	2,96	4,15	2,82	6,79	5,32	8,9
	Inibidor de endopeptidase	Apoptose	Serpina3g	20715	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3G	5,29	1,52	2,83	7,88	4,62	11,68	9,69	49,91
	NC	Ativação do complemento	C1qb	12260	Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	1,41	1,91	1,91	3,26	1,82	3,52	2,6	4,51
		Apoptose	Bcl2a1d	12047	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d	2,4	1,58	1,53	3,39	2,27	4,26	2,86	7,1
	Atividade de caspase	Apoptose	Casp1	12362	Caspase 1	2,88	2,01	2,04	4,84	2,08	2,58	3,24	11,0
	Poli-A-polimerase	NC	Parp9	80285	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	4,53	6,1	3,32	9,47	7,97	11,35	8,57	11,87
		Resposta à vírus	Zc3hav1	78781	Zinc finger CCCH type, antiviral 1	4,25	3,92	2,38	6,85	7,15	10,5	5,78	15,56
	Atividade catalítica	Resposta à vírus	Rsad2	58185	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	2,64	2,48	2,03	7,77	3,85	7,79	6,04	15,5
		Induzido por IFN	Samhd1	56045	SAM domain and HD domain 1	1,78	2,03	1,84	5,83	2,21	5,28	3,8	11,72
	Biosíntese de dTTP	Resposta à LPS	Tyki	22169	Thymidylate kinase family LPS-inducible member	1,2	2,51	1,76	3,73	2,51	3,54	3,1	6,54
	NC	Induzido por IFN	lfi44	99899	Interferon-induced protein 44	8,61	11,18	7,3	14,45	24,96	26,24	14,16	30,55
			lfi27	76933	Interferon, alpha-inducible protein 27	8,62	6,24	12,9	21,0	18,79	13,23	30,71	51,34
	NC	Induzido por IFN	lfi47	15953	Interferon gamma inducible protein 47	9,47	12,4	8,7	38,0	16,7	30,18	36,59	98,98
	NC	NC	lfi202b	26388	Interferon activated 202B	8,29	11,5	8,38	40,1	12,59	33,64	32,0	91,69
			Plac8	231507	Placenta-specific 8	15,2	14,1	12,4	33,0	15,54	34,24	24,69	75,6
Resposta de Defesa	Ancora de GPI	Proliferação celular	Ly6a	110454	Lymphocyte antigen 6 complex, locus A	3,11	2,40	2,38	10,79	5,44	6,88	7,99	8,59
		NC	Ly6c1	56778	Lymphocyte antigen 6 complex, locus C	1,82	2,14	1,62	5,30	2,0	3,68	3,6	10,39
			Ly6f	17071	Lymphocyte antigen 6 complex, locus F	3,33	1,67	2,70	7,41	2,71	2,74	7,18	12,19

	Ligação à proteína	Adesão celular	Ly9	17085	Lymphocyte antigen 9	2,53	1,69	1,81	3,39	2,43	4,88	2,0	8,25
	Associado à macrófago	NC	Mpeg1	17476	Macrophage expressed gene 1	1,51	2,91	2,3	4,41	2,26	5,03	4,55	7,84
Ciclo de ubiquitina	Ligase de ubiquitina	Induzido por IFN	Dtx31	209200	Deltex 3-like (Drosophila)	3,04	3,73	3,59	4,74	5,03	7,34	4,65	7,96
			Herc5	67138	Hect domain and RLD5	3,48	4,15	3,0	6,98	5,58	11,88	5,92	21,65
			Trim25	217069	Tripartite motif protein 25	3,23	4,52	3,57	4,61	4,59	6,38	4,77	6,24
		Modificação de proteína	Ube2l6	56791	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L6	1,33	2,08	3,28	2,59	1,25	3,11	4,86	4,73
			Trim21	20821	Tripartite motif protein 21	3,52	6,72	3,3	9,68	7,05	11,52	5,79	18,47
	Ativação de ubiquitina	Modificação de proteína	Ube1l	74153	Ubiquitin-activating enzyme E1-like	1,84	4,32	2,9	5,91	4,31	10,48	5,73	7,34
	Ligação à proteína	Induzido por IFN	Isg15	53606	ISG15 ubiquitin-like modifier	10,4	22,3	9,41	26,9	29,08	12,50	23,65	10,83
	Peptidase	Induzido por IFN	Usp18	24110	Ubiquitin specific protease	18,0	31,6	18,3	26,9	46,13	73,25	36,37	73,43
Transdução de sinal	Receptor	Apoptose	Tspo	12257	Translocator protein	1,51	2,06	1,82	2,68	2,31	3,61	3,9	6,57
		NC	Fgl2	14190	fibrinogen-like protein 2	1,94	1,42	1,67	3,43	1,81	3,09	2,93	10,16
			Ms4a6d	68774	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4D	4,92	3,2	2,16	5,11	2,78	4,51	3,76	19,44
			Ms4a4c	64380	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4C	4,2	2,85	-1,03	14,48	3,34	14,25	7,63	48,81
				293749	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B	3,05	1,52	2,18	3,51	3,59	6,77	3,42	12,73
Chaperona	Ligação à ATP	Dobramento de proteína	Tor3a	30935	Torsin family 3, member A	2,5	4,58	3,05	9,18	5,82	11,98	8,1	13,77
Metabolismo	Fosfolipase	Catabolismo lipídico	Pld4	104759	Phospholipase D family, member 4	2,0	2,16	1,48	3,71	1,52	3,28	2,51	5,36
Resposta inflamatória	Atividade de oxireductase	Fagocitose	Cybb	13058	Cytochrome b-245, beta polypeptide	2,96	1,77	1,18	8,21	1,74	10,85	6,02	17,84
	Receptor		Cd14	12475	CD14 antigen	3,27	1,68	1,76	2,01	1,43	2,59	2,54	4,74
NC	Poli-A-polimerase	Regulação da transcrição	Parp14	547253	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	5,42	6,51	2,71	13,2	8,36	14,68	9,0	18,33
		NC	Parp12	243771	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	3,81	4,96	3,91	8,48	6,66	12,52	8,55	14,66
	Helicase	NC	BC013672	234311	cDNA sequence BC013672	7,31	7,97	3,1	13,7	9,32	28,06	11,05	31,26
	Transporte de proteína	NC	4930599N2 3Rik	75379	RIKEN cDNA 4930599N23 gene	2,11	2,95	1,74	2,07	2,46	6,12	3,39	7,25

			Mitd1	69028	RMIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1	1,8	1,66	1,55	3,17	2,65	3,91	3,0	4,12
	Quinase	NC	Mlkl	74568	Mixed lineage kinase domain-like	4,29	4,48	2,3	3,96	4,23	9,62	6,38	15,40
	Ligação à DNA	NC	Zbp1	58203	Z-DNA binding protein 1	2,79	2,48	1,96	4,98	3,54	7,16	4,33	21,46
		Apoptose	Scotin	66940	Scotin	3,49	2,59	3,77	2,69	3,35	3,38	4,04	2,89
	Receptor	Induzido por IFN	Rtp4	67775	Receptor transporter protein 4	2,75	4,1	2,4	2,64	4,34	5,68	2,78	3,93
	Ligação à proteína e ácido nucléico	Induzido por IFN	Trim34	94094	Tripartite motif protein 34	2,47	2,72	2,04	2,72	5,27	4,69	2,63	4,3
		NC	Trim30	20128	Tripartite motif protein 30	3,93	5,54	2,82	8,05	6,52	11,41	6,91	12,03
	NC	Proliferação celular	Slfn2	20556	Schlafen 2	3,32	2,51	2,02	5,3	4,54	7,03	6,4	18,27
NC	NC	NC	BC006779	229003	cDNA sequence BC006779	2,24	3,67	2,34	3,88	3,09	6,38	3,17	9,31
			Epsti1	108670	Epithelial stromal interaction 1 (breast)	2,24	4,41	2,89	4,64	3,32	12,18	5,63	18,13
			D12Ert647 e	52668	DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 647, expressed	2,96	3,06	2,24	1,86	2,64	1,68	1,17	1,3
			Samd9l	209086	Sterile alpha motif domain containing 9-like	4,04	6,67	4,16	13,0	8,54	20,45	13,14	27,37
			D14Ert668 e	219132	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 668, expressed	3,56	5,97	3,3	10,4	8,29	20,25	12,16	31,54
			Phf11	219131	PHD finger protein 11	5,85	6,11	3,52	16,7	12,43	21,64	17,01	28,97
			0610037M1 5Rik	68395	RIKEN cDNA 0610037M15 gene	3,59	6,29	3,07	6,14	6,63	14,0	7,28	14,93
			9830115L1 3Rik	319257	RIKEN cDNA 9830115L13 gene	3,14	5,85	8,29	5,27	6,41	10,47	8,85	16,66
			A630077B1 3Rik	215900	RIKEN cDNA A630077B13 gene	2,85	1,36	1,32	7,16	1,86	2,87	2,56	24,03
			C4a	625018	Complement component 4A (Rodgers blood group)	2,07	3,51	3,03	5,04	2,68	6,43	5,2	10,05
			Gp49a	14727	Glycoprotein 49A	3,95	1,26	1,61	4,59	1,53	2,65	2,69	26,2
			Drdl	114573	Differentially regulated in lymphoid organs and differentiation	1,87	1,33	1,88	3,54	3,69	3,83	3,47	7,85
			H2-T17	15032	Histocompatibility 2, T region locus 17	5,46	3,17	1,37	9,83	5,73	15,9	12,78	16,63
			Rnf213	629974	Ring finger protein 213	4,2	8,44	3,43	7,05	10,27	21,12	5,73	13,8

* NC: Não classificados

1. Genes com mais de uma sonda tiveram seu valor de intensidade definido como a média entre as sondas.

2. Classificação funcional dos genes foi realizada utilizando-se os bancos de dados Entrez Gene (www.ncbi.nih.gov) e Gene Ontology (www.geneontology.org).

4.3.1 Análise das vias moduladas durante a infecção do SNC de camundongos com DENV-1 e PCR em tempo real.

A tecnologia de microarranjo de DNA permite, além da busca por possíveis genes alvos para terapia, conhecer quais as principais vias, ou processos biológicos que o agente infeccioso induz no hospedeiro. O conhecimento destas vias ou processos pode auxiliar na compreensão da patogenia do processo infeccioso, e levar em última instância ao desenvolvimento de novas terapias (VENTER et al., 2005; UBOL et al., 2006).

Com o objetivo de avaliar quais as principais vias estimuladas na infecção do SNC de camundongos com o vírus DENV-1, realizaram-se análises dos genes selecionados nos experimentos de microarranjo (Tabela 4.2) com o software *Ingenuity® Systems* (Figura 4.12). O Ingenuity Pathways Analysis Knowledge Base é um banco de dados curado, construído com base em centenas de milhares de artigos científicos, livros e outras bases de dados disponíveis, por cientistas altamente qualificados. A lista contendo os 148 genes modulados durante a infecção com os vírus DENV-1 foram analisadas com a utilização deste banco de dados, segundo critérios definidos em Matérias e Métodos, seção 3.9.1.

Foi possível demonstrar que as principais vias moduladas durante a infecção são aquelas relacionadas com a resposta imune, como por exemplo, a via de sinalização por interferon, apresentação de antígeno, ativação do complemento e via de ubiquitinação. Um grande número de fatores de transcrição, incluindo o *Stat1* e *Stat2* (do inglês, *signal transducer and activator of transcription 1* e *2*), fator de transcrição dependente de interferon-3 (*Isgf3g* ou *Irf9*) e os fatores reguladores de interferon 1 e 7 (*Irf1* e *Irf7*), são superexpressos no SNC de camundongos infectados com ambas as cepas de DENV-1, o que claramente demonstra a ativação da via de sinalização por interferon (IFN).

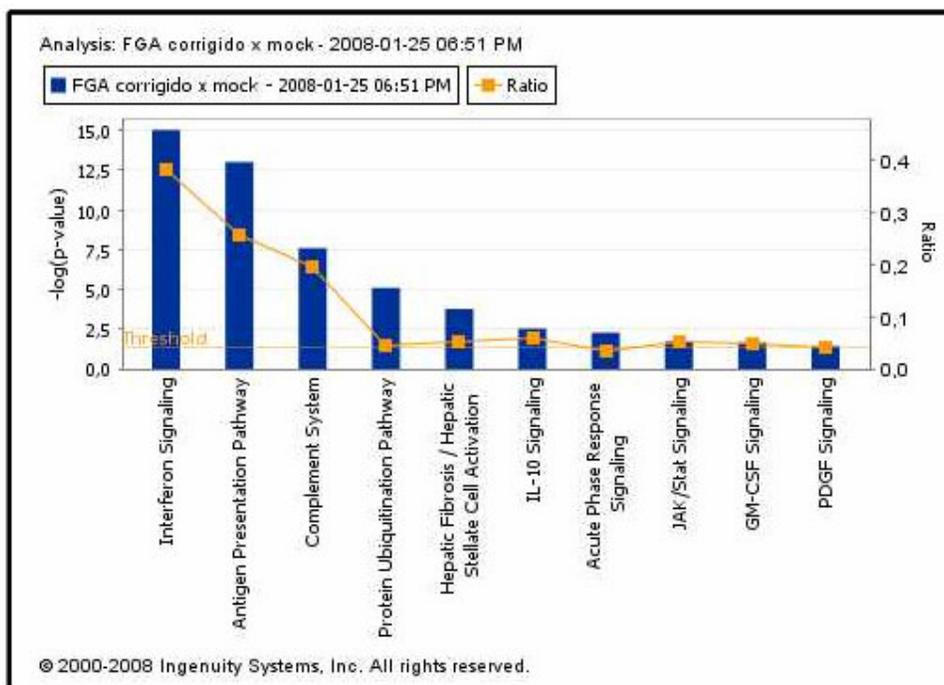


Figura 4.12: Principais vias moduladas durante a infecção do SNC murino por DENV-1. Anotação funcional FGA relativa aos 148 genes modulados durante a infecção com ambos os vírus, FGA/89 e FGA/NA a5c, comparados aos animais infectados com o *mock*. Os dados de microarranjo foram analisados pelo software *Ingenuity® Systems*. No eixo X observam-se as principais funções biológicas selecionadas e em Y a significância estatística de cada uma das vias (expressa como valor p de 0,05 de linha de corte). À direita, o *Ratio*, que é calculado considerando o número de genes presentes nos resultados que participam de uma determinada via, dividido pelo número total de genes da referida via. *Interferon Signaling* - sinalização por interferon; *Antigen Presentation Pathway* – via de apresentação de antígeno; *Complement and Coagulation Cascades* – cascata do complemento e coagulação; *Protein Ubiquitination Pathway* – via de ubiquitinação de proteínas; *IL-10 Signaling* – sinalização por IL-10; *Chemokine Signaling* – sinalização por quimiocina; *Toll-like Receptor Signaling* – sinalização por receptores tipo Toll; *JAK/Stat Signaling* – sinalização por JAK/Stat; *GM-CSF Signaling* – sinalização por GM-CSF; *PDGF Signaling* – sinalização por PDGF. JAK (Quinase do tipo Janus); GM-CSF (Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos).

Além dos genes da via de IFN, pode ser observado um grande número de genes estimulados por IFN (ISGs) envolvidos na resposta imune inata contra vírus, como as famílias dos genes de resistência a mixovírus (*Mx1* e *Mx2*), genes do sistema *Oas/RNase L*, família de proteínas com domínios de tetracopeptídeos (*Ifit1*, *Ifit2* e *Ifit3*), entre outros (Figura 4.13). Adicionalmente, as análises realizadas revelaram que esta via é a mais fortemente modulada pela infecção, com o menor valor de p ($8,96 \times 10^{-16}$), com um *ratio* de 0,379, e dos 29 genes totais da via, 11 são modulados.

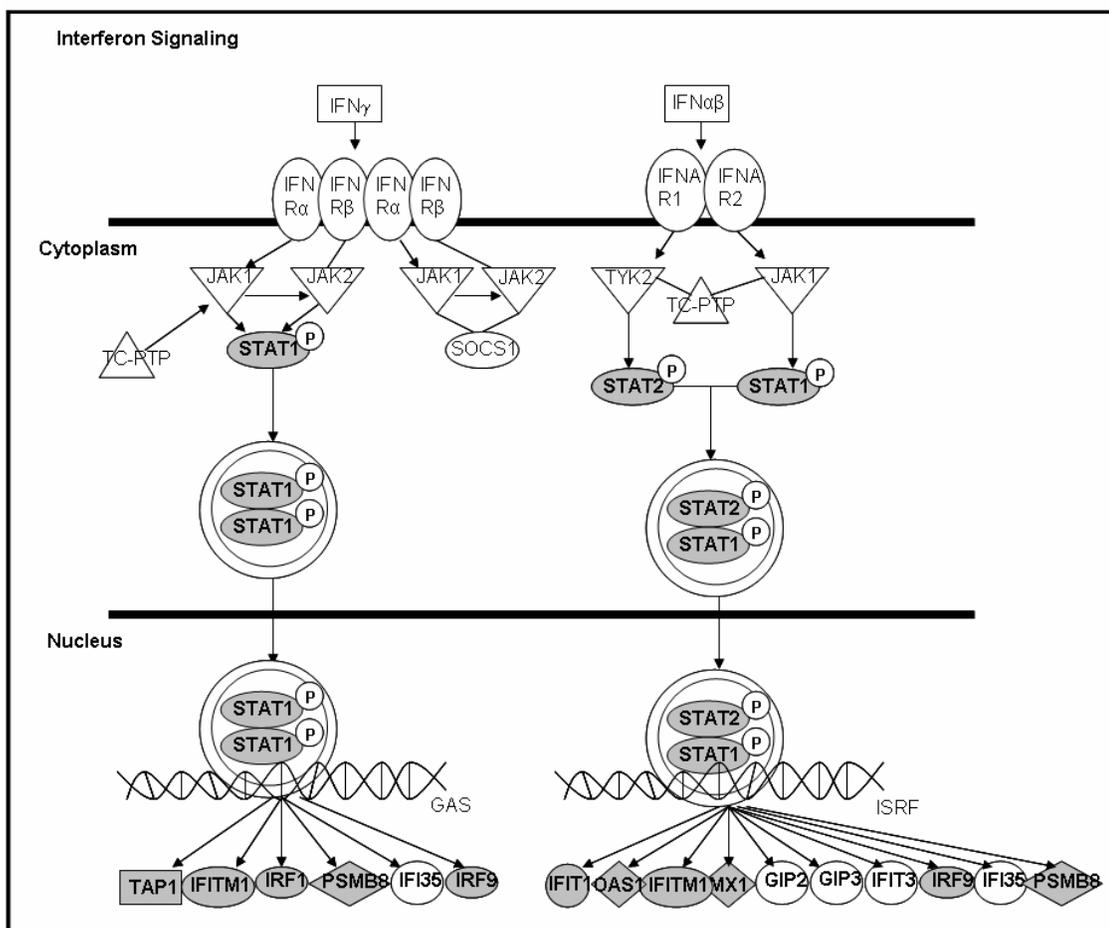


Figura 4.13: Representação dos genes modulados na via de sinalização por IFN. A lista contendo os 148 genes modulados durante a infecção pelo vírus dengue sorotipo 1 (FGA/89 e FGA/NA a5c) foi analisada com a utilização do software *Ingenuity[®] Systems*. A via de sinalização por IFN foi a que demonstrou menor valor de $p = 8,96 \times 10^{-16}$, e melhor relação de genes representados na via (11/29). Em cinza estão identificados os genes modulados durante a infecção por DENV-1 no SNC murino.

Para confirmar as análises de microarranjo foram realizados ensaios de PCR quantitativo (qPCR) de genes selecionados de diferentes vias. Geimonen et al. (2002), demonstraram que quantidades muito elevadas de mRNA para um determinado gene podem saturar o microarranjo, não permitindo quantificar a real magnitude da modulação em sua expressão. Para tanto foram desenhados iniciadores específicos (ver Materiais e Métodos, seção 3.10) para genes envolvidos nas quatro principais vias moduladas durante a infecção: via de sinalização de IFN, apresentação de antígeno, ativação do complemento e ubiquitinação de proteína.

A expressão de 29 genes foi analisada por PCR quantitativo (qPCR). Destes genes, 7 foram diretamente relacionados com a via de sinalização por IFN tipo I

(α/β). Os genes da via de sinalização por interferon selecionados podem ser divididos em genes envolvidos na regulação da expressão da via IFN, e genes estimulados por IFN com atividade antiviral (Figura 4.14 e 4.15, respectivamente). ISGs codificam uma grande quantidade de proteínas, muitas com atividade antiviral. Por exemplo, os genes da família 2'-5' oligoadenilato sintetase (*Oas1b*, *Oas1g*, *Oas1l*, *Oasl2*, *Oas1a* e *Oas2*) conferem resistência à infecção pelo vírus da febre do oeste do Nilo (WNV, do inglês *West Nile Virus*) (KAJASTE-RUDNITSKI et al., 2006).

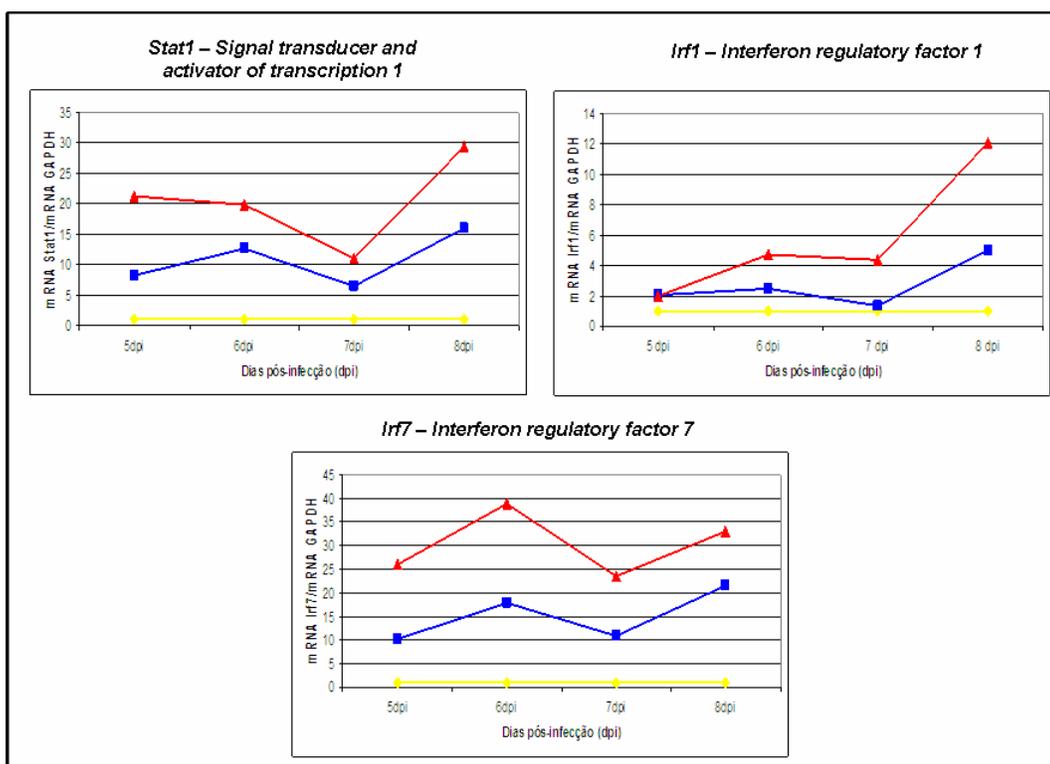


Figura 4.14: Quantificação da modulação dos genes da via de sinalização por IFN, utilizando PCR em tempo real. Genes envolvidos na regulação da via de sinalização por IFN (*Stat1*, *Irf1* e *Irf7*), foram quantificados por qPCR no SNC de camundongos suíços infectados com as cepas FGA/89 (azul), FGA/NA a5c (vermelho) e *mock* (amarelo) em 5, 6, 7 e 8 dpi. Ver cálculo dos valores no item 3.10 de Materiais e Métodos.

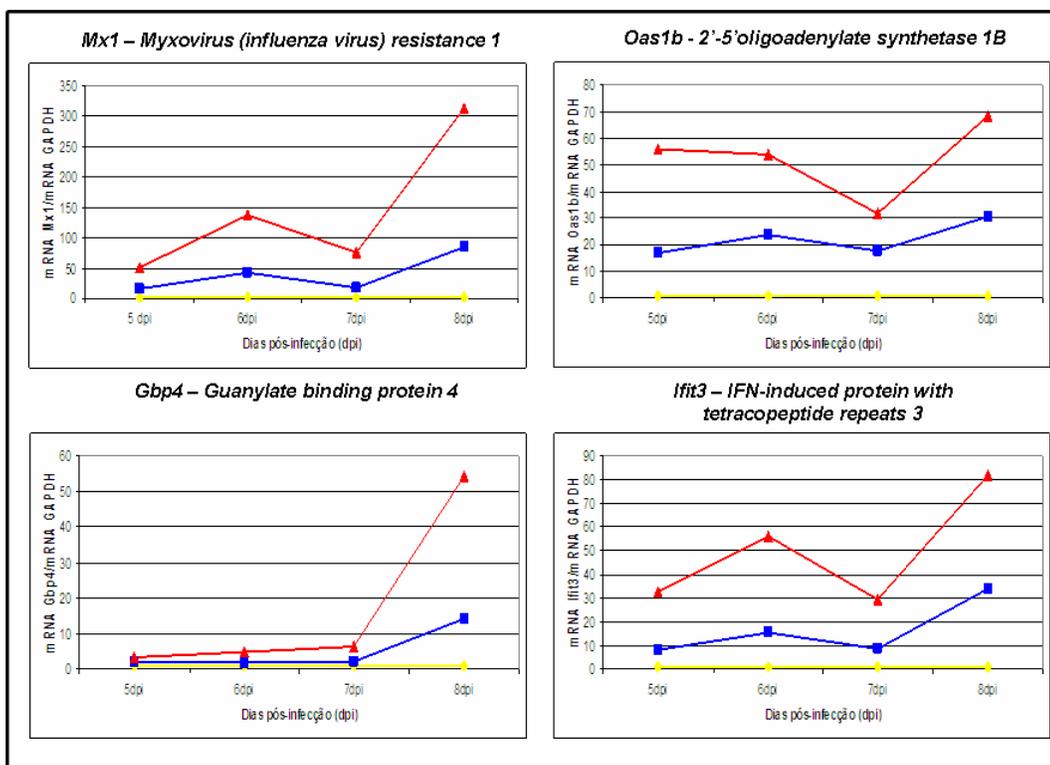


Figura 4.15: Quantificação da modulação de ISGs, utilizando PCR em tempo real. Genes estimulados por IFN com atividade antiviral (*Oas1b*, *Ifit3*, *Gbp4*, *Mx1*), foram quantificados por qPCR no SNC de camundongos suíços infectados com as cepas FGA/89 (azul), FGA/NA a5c (vermelho) e *mock* (amarelo) em 5, 6, 7 e 8 dpi. Ver cálculo dos valores no item 3.10 de Materiais e Métodos.

As análises revelaram outras vias moduladas durante a infecção, que podem desempenhar um papel relevante na infecção por DENV-1 no SNC murino. Destas, duas se destacam pelo baixo valor de p ($9,19 \times 10^{-14}$ e $2,46 \times 10^{-8}$) e pela relação de genes representados (*ratio*), que são as vias de apresentação de antígenos e de ativação de complemento. A apresentação de antígenos via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é de fundamental importância no desenvolvimento da resposta imune adaptativa. No entanto, a sua ocorrência no SNC é tema de discussão e controvérsia, especialmente, com relação a quais células realizam tal função e a importância deste processo na patologia de doenças infecciosas e neurodegenerativas no SNC (GENDELMAN, 2002).

Os experimentos de microarranjo demonstraram a modulação na expressão de genes envolvidos na formação do imunoproteosoma (*Psm8* e *Psm9*), transporte de antígenos para o retículo endoplasmático rugoso (*Tap1* e *Tap2*) e na apresentação de antígenos na superfície celular para linfócitos CD8 e CD4, via

moléculas de MHC classe I e II, respectivamente (*H2-Ea*, *H2-Q8*, *B2m*, *H2-L*, entre outros; Figura 4.16).

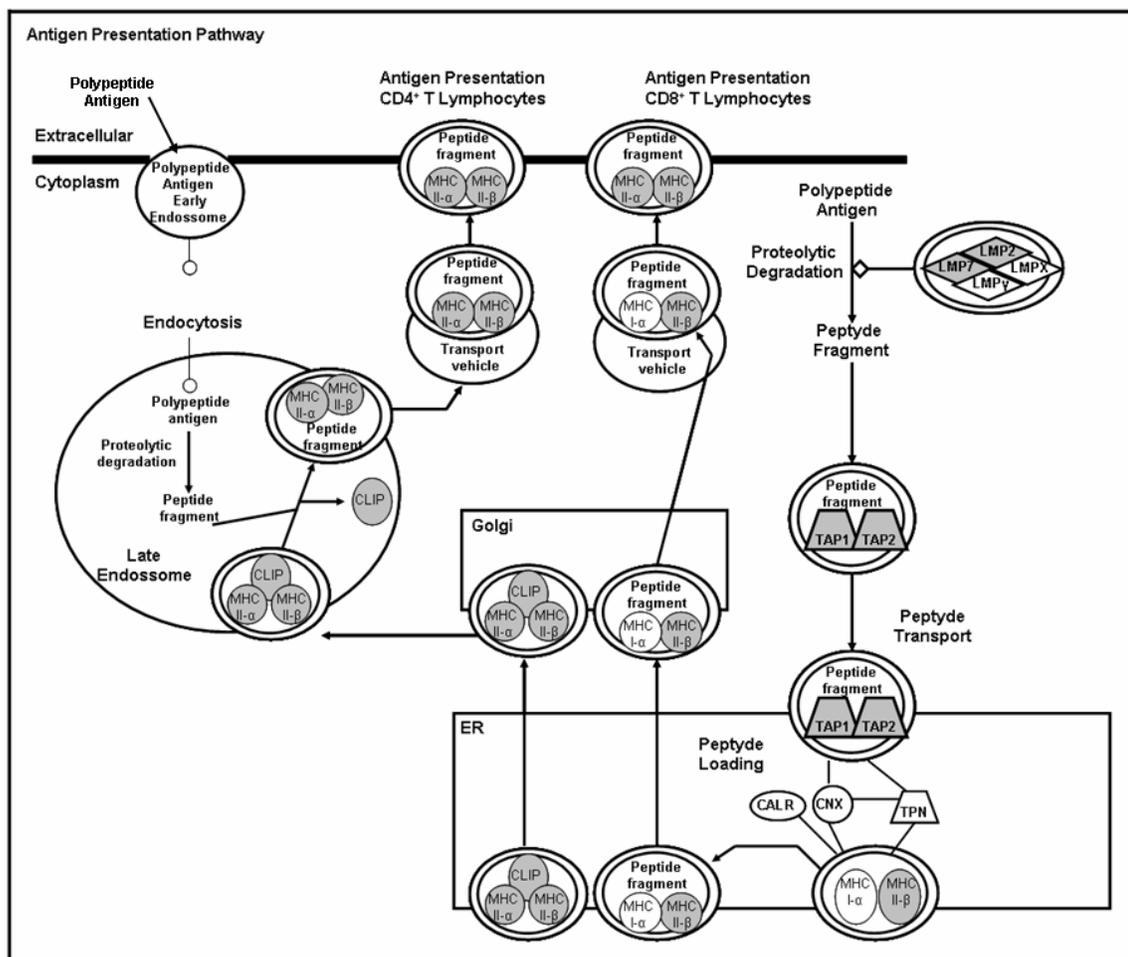


Figura 4.16: Representação esquemática da via de apresentação de antígenos. A lista contendo os 148 genes modulados durante a infecção pelo vírus dengue sorotipo 1 (FGA/89 e FGA/NA a5c) foi analisada com a utilização do software *Ingenuity® Systems*. A via apresentou valor de $p = 9,19 \times 10^{-14}$, bem como, 10 genes modulados em 39. Em cinza estão representados os genes desta via, modulados durante a infecção por DENV-1 no SNC murino.

Da mesma forma que na via de sinalização por IFN, a modulação de genes da via de apresentação de antígenos foi analisada por PCR em tempo real. Os genes desta via foram divididos em genes responsáveis pelo processamento de antígenos, e genes envolvidos na apresentação dos mesmos na superfície celular. Genes envolvidos na formação do imunoproteosoma (*Psmb8* e *Psmb9*) e genes que realizam o transporte de antígenos do citoplasma celular para o retículo

endoplasmático rugoso (*Tap1* e *Tap2*; Figura 4.17), foram avaliados por qPCR, bem como, os genes de MHC classe I e II (*H2-Q8*, *H2-K1* e *H2-Ea*; Figura 4.18).

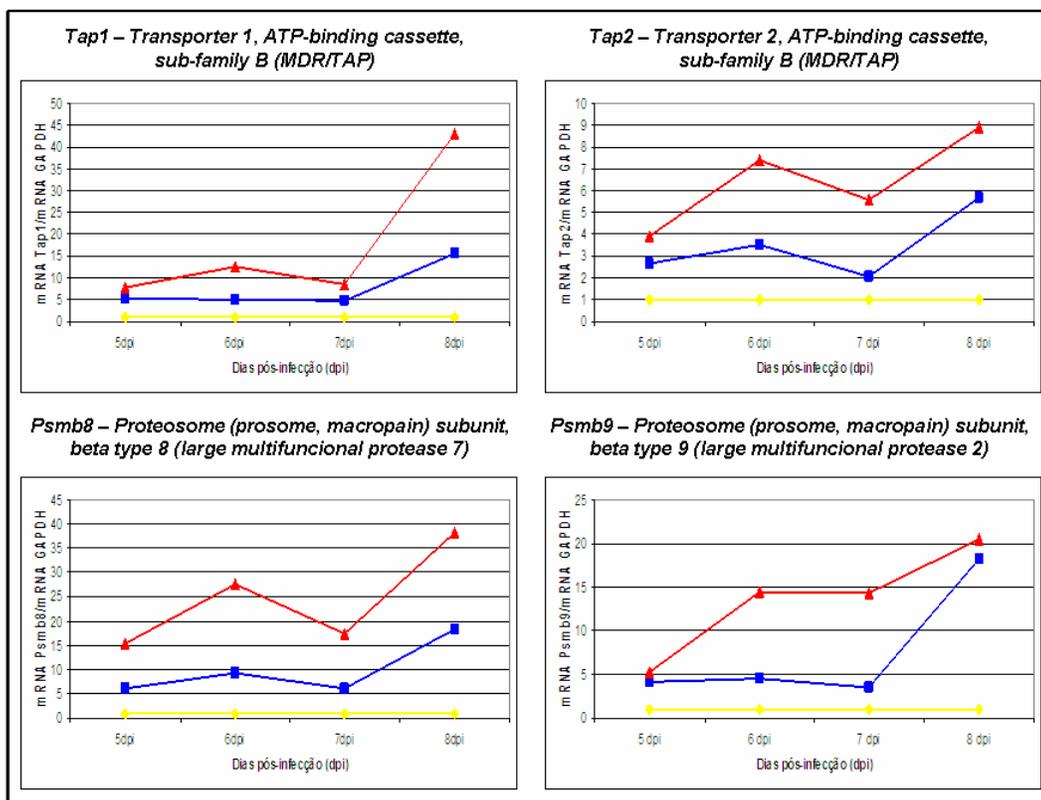


Figura 4.17: Quantificação da modulação dos genes envolvidos no processamento e transporte de antígenos para o RER, por qPCR. Modulação da expressão de genes de processamento (*Psmb8* e *Psmb9*) e transporte de antígenos (*Tap1* e *Tap2*) para o RER, no SNC de camundongos suíços infectados com as cepas FGA/89 (azul), FGA/NA a5c (vermelho) e *mock* (amarelo) em 5, 6, 7 e 8 dpi. Ver cálculo dos valores no item 3.10 de Materiais e Métodos.

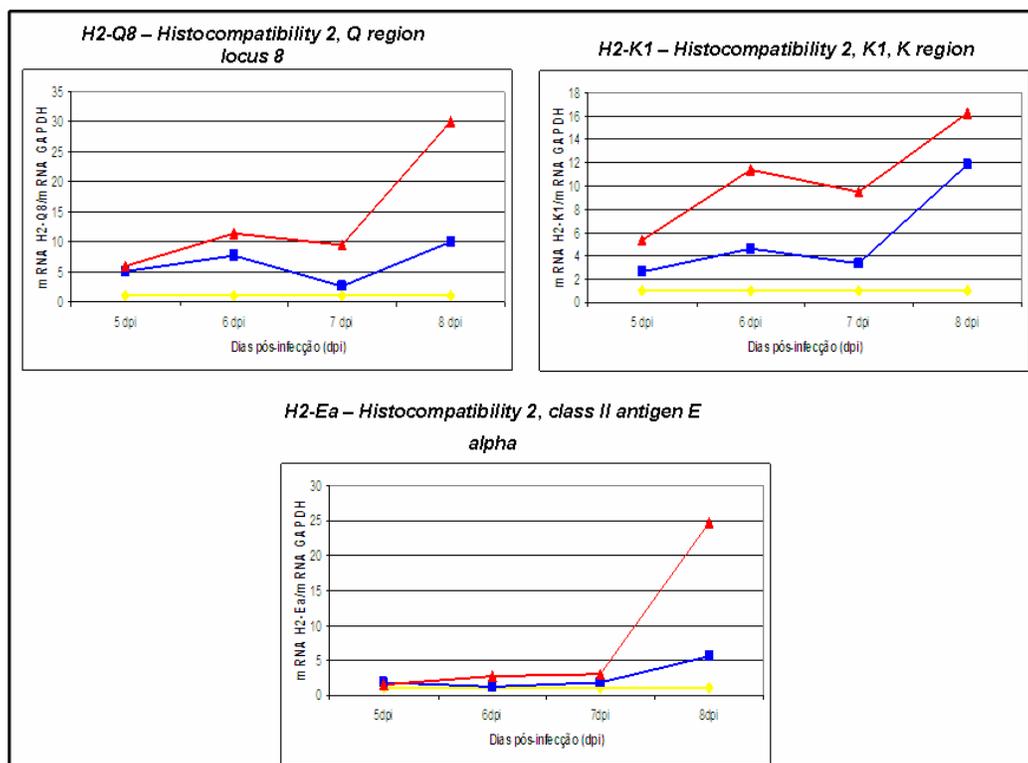


Figura 4.18: Quantificação da modulação dos genes de MHC classe I e II por qPCR. Modulação da expressão dos genes de MHC classe I e II (*H2-Q8* e *H2-K1*) no SNC de camundongos suíços infectados com as cepas FGA/89 (azul), FGA/NA a5c (vermelho) e *mock* (amarelo) em 5, 6, 7 e 8 dpi. Ver cálculo dos valores no item 3.10 de Materiais e Métodos.

O sistema complemento (SC) é formado por uma família de mais de 30 proteínas, presentes na circulação e na membrana celular, que são importantes na resposta imune inata contra microorganismos invasores. Estas proteínas incluem receptores de superfície celular que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), ligantes próprios alterados, ou ainda complexos antígeno-anticorpo (CARROLL, 2004). A ativação do sistema complemento (SC) foi inicialmente implicada na patogenia da dengue, em 1973, em um trabalho de Bokisch et al.

As células do SNC são capazes de sintetizar componentes do SC e, sabe-se que a mielina e os oligodendrócitos são capazes de ativar a via clássica de ativação do complemento, *in vitro*, na ausência de anticorpos. Adicionalmente, foi demonstrado que a ativação do SC no SNC pode, além de causar danos ao tecido, ter efeitos neuroprotetores, eliminando depósitos amilóides e neurônios degenerados, o que poderia ter um efeito benéfico ao tecido inflamado (RUS et al., 2006).

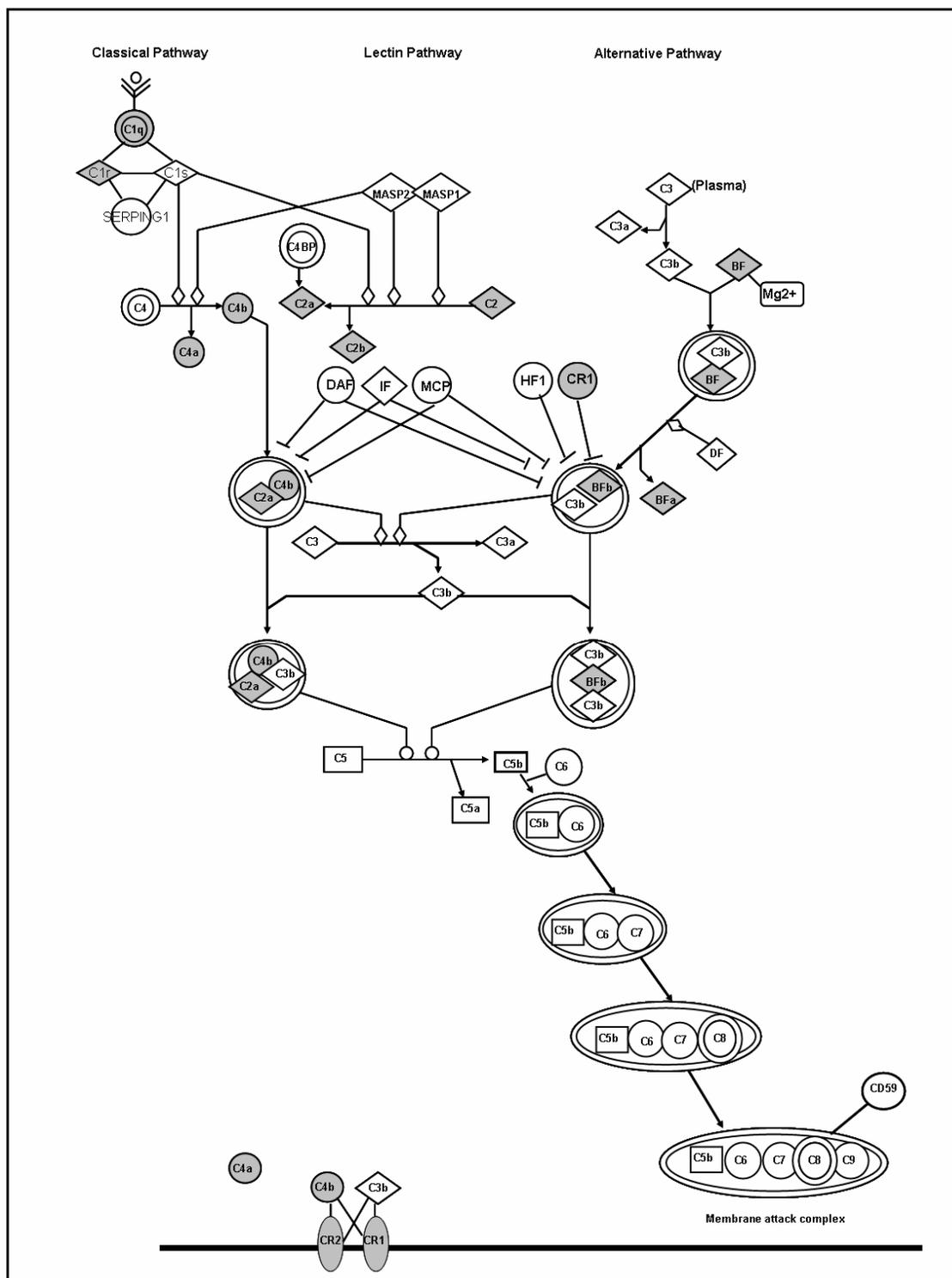


Figura 4.19: Representação da via de ativação do complemento. A lista contendo os 148 genes modulados durante a infecção pelo vírus dengue sorotipo 1 (FGA/89 e FGA/NA a5c) foi analisada com a utilização do software *Ingenuity[®] Systems*. A via apresentou valor de $p = 2,46 \times 10^{-8}$, e apresentou 7 genes modulados em 36. Em cinza estão representados os genes desta via, modulados durante a infecção por DENV-1 no SNC murino.

A infecção pelo DENV-1 no SNC murino induziu a ativação de genes da via de ativação do complemento (Figura 4.19). As análises com o software *Ingenuity® Systems* apresentou para a via de ativação do complemento, um valor de $p = 2,46 \times 10^{-8}$, contendo 7 genes representados nos 36 genes da via ($ratio = 0,194$). A modulação dos genes *C1r* e *H2bf* ou *Cfb*, envolvidos na ativação do sistema complemento, foi analisada por PCR em tempo real utilizando-se iniciadores específicos (Figura 4.20).

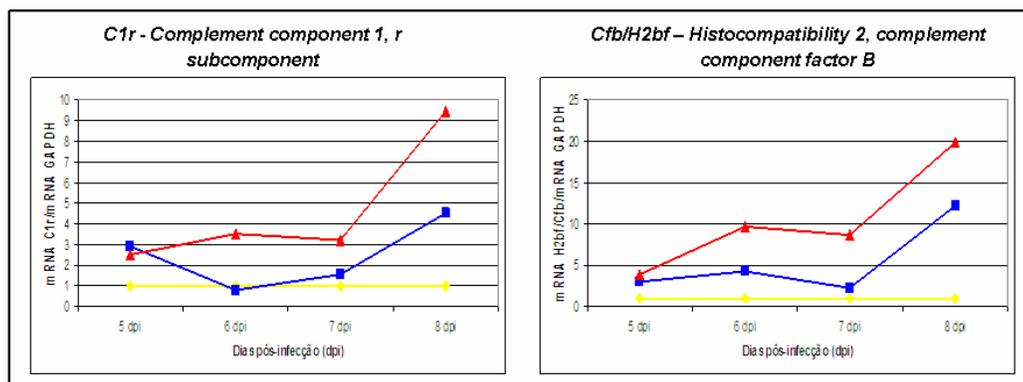


Figura 4.20: Quantificação da modulação dos genes da via de ativação do complemento. Modulação da expressão de genes de ativação do complemento (*C1r* e *Cfb/H2bf*) no SNC de camundongos suíços infectados com as cepas FGA/89 (azul), FGA/NA a5c (vermelho) e *mock* (amarelo) em 5, 6, 7 e 8 dpi. Ver cálculo dos valores no item 3.10 de Materiais e Métodos.

A quarta via representada na análise foi à de ubiquitinação. Apesar de o valor de p obtido para esta via ter sido baixo, $p = 7,96 \times 10^{-6}$, o número de genes presentes nos dados de microarranjo representados dentro o número total de genes da via, foi pequeno, apenas 9 em 203 genes (Figura A2.3, Anexo 2). No entanto, em virtude do gene *Usp18* (do inglês, *ubiquitin specific protease 18*) ter sido um dos genes mais modulados durante a infecção por DENV-1 no SNC murino, além do fato desta via ter sido recentemente implicada na resposta imune inata contra vírus, optou-se por avaliar a expressão de seus genes por qPCR (Figura 4.21).

Esta via funciona como uma via clássica de ubiquitinação, no entanto, seus alvos e sua função não são completamente conhecidos. Sabe-se que esta via é importante na embriogênese e na resposta imune, especialmente a mediada por IFNs (REMPEL et al., 2007; RITCHIE et al., 2004).

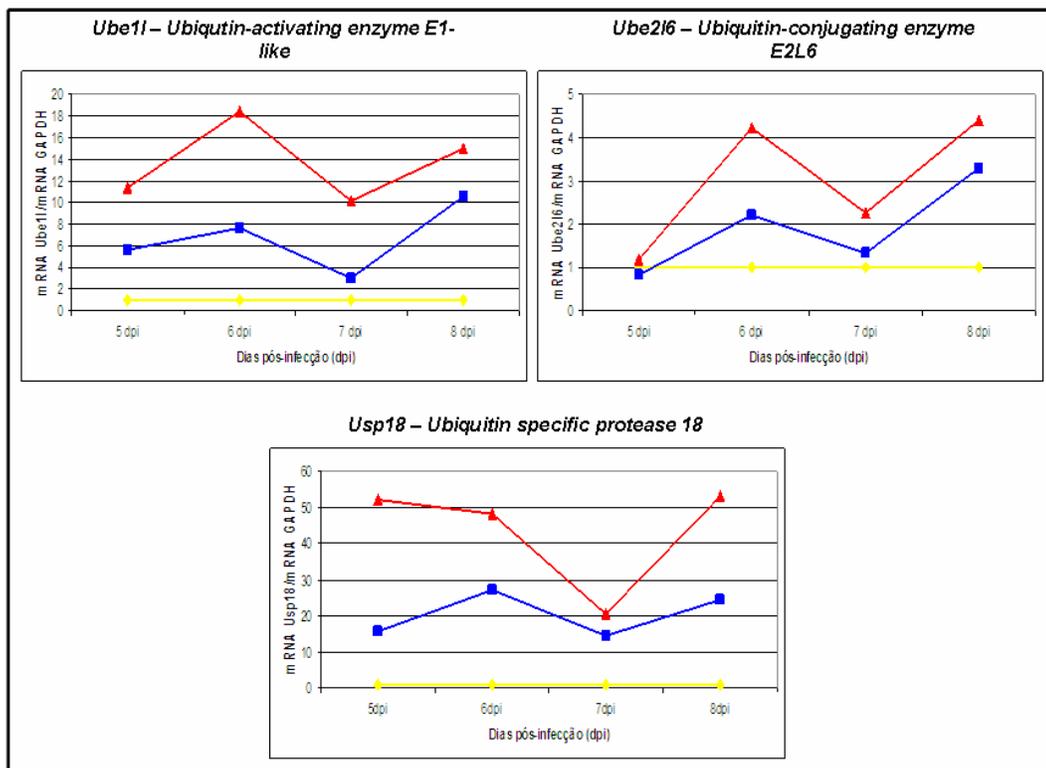


Figura 4.21: Quantificação da modulação dos genes da via tipo-ubiquitina por PCR em tempo real. Modulação da expressão de genes da via tipo-ubiquitina (*Ube1*, *Ube216* e *Usp18*) no SNC de camundongos suíços infectados com as cepas FGA/89 (azul), FGA/NA a5c (vermelho) e *mock* (amarelo) em 5, 6, 7 e 8 dpi. Ver cálculo dos valores no item 3.10 de Materiais e Métodos.

Além da quantificação da expressão de genes representantes das principais vias moduladas durante a infecção pelo vírus da dengue, foi realizada a quantificação de mais 10 genes por qPCR. Destes 10 genes, 5 codificam para quimiocinas (ver adiante), 3 para proteínas envolvidas em adesão (*Icam1*), apoptose (*Serpina3g*) e proliferação celular (*Cd274*), e os dois últimos também estão envolvidos na resposta imune (Figura A2.4). No total, 29 genes tiveram sua modulação confirmada por qPCR.

Os outros dois genes quantificados por qPCR, foram os do IFN- α e - β . Apesar de ter sido observado a expressão de um grande número de genes estimulados por IFN (ISGs), não observou-se a modulação na expressão dos transcritos de IFN- α e - β , por microarranjo. As análises de qPCR de ambos os genes, mostraram a modulação em maior nível do gene de IFN- β em comparação ao de IFN- α . A modulação na expressão do gene de IFN- β variou entre 1,1 e 2,9 x na infecção com a cepa FGA/89, e 1,5 e 8,2 x na infecção com a cepa FGA/NA a5c,

entre os dias 5 e 8 pós-infecção, enquanto que o gene de IFN- α variou entre 0,8 e 1,6 x na infecção com a cepa FGA/89, e 0,8 e 2,1 x na infecção com a cepa FGA/NA a5c (Figura 4.22).

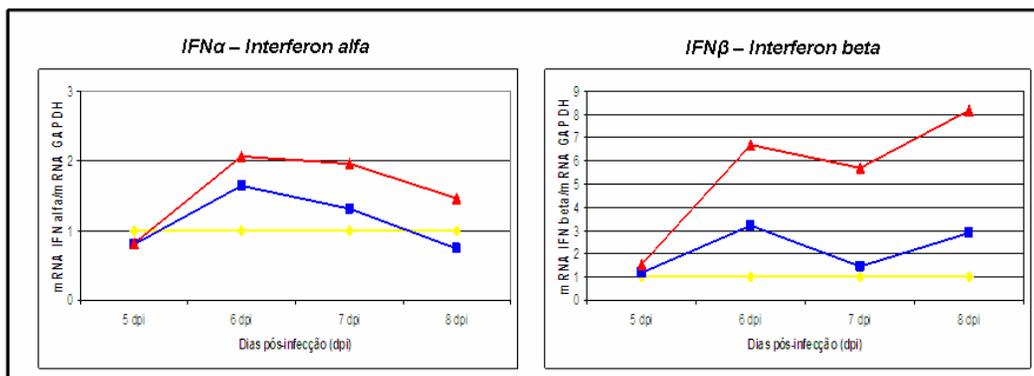


Figura 4.22: Quantificação da modulação dos genes IFN- α/β . Modulação da expressão de genes IFN- α/β no SNC de camundongos suíços infectados com as cepas FGA/89 (azul), FGA/NA a5c (vermelho) e *mock* (amarelo) em 5, 6, 7 e 8 dpi. Ver cálculo dos valores no item 3.10 de Materiais e Métodos.

Adicionalmente, pode-se observar que os níveis da expressão dos genes quantificados por qPCR e microarranjo, apresentaram um mesmo padrão de modulação independentemente da técnica utilizada. No entanto, para alguns genes, observaram-se diferenças significativas nos valores de modulação entre as duas técnicas (Figuras 4.23 e A2.7). Uma possível explicação para este fato seria a diferença de sensibilidade das técnicas. Park & Stegall (2007), demonstraram que genes expressos em baixos níveis, como as citocinas, devem ser quantificados por técnicas mais sensíveis, como o qPCR. Além disso, o qPCR tem sido considerada a técnica padrão para quantificação da expressão gênica, devido a sua alta especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade e precisão, quando comparada a outras técnicas (WANG et al., 2006).

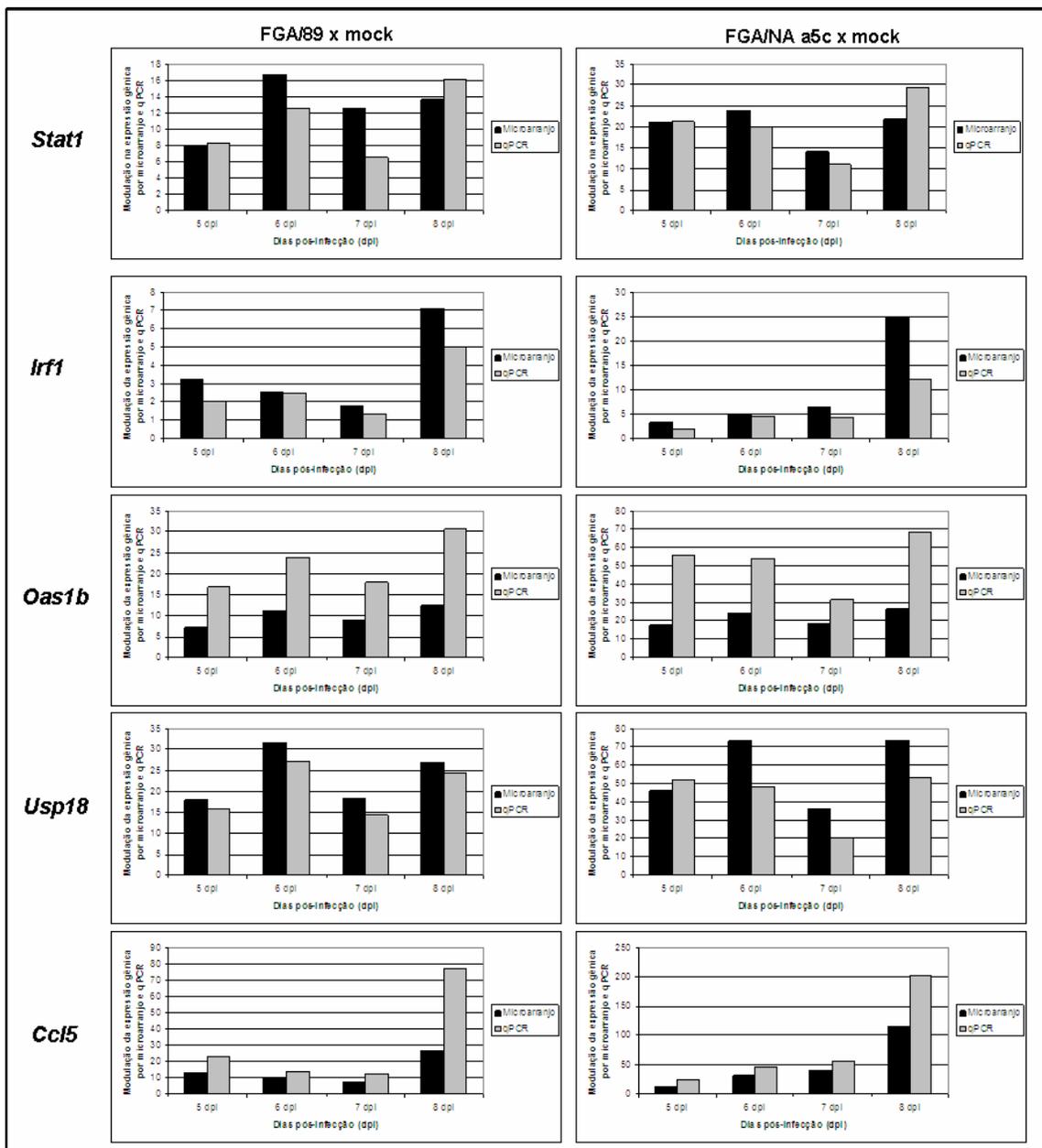


Figura 4.23: Comparação da modulação da expressão gênica obtida pelas técnicas de microarranjo e qPCR. A modulação da expressão dos genes *Stat1*, *Irf1*, *Oas1b*, *Usp18* e *Ccl5*, no SNC murino infectado com as cepas FGA/89 e FGA/NA a5c (comparada aos animais infectados com *mock*) foi quantificada por microarranjo e qPCR. No Anexo 2, Figura A2.7, encontram-se as comparações de mais 20 genes presentes na tabela 4.2.

4.3.2 Análise da expressão gênica diferencial induzida pela cepa neurovirulenta (FGA/NA a5c) versus a cepa parental (FGA/89).

Apesar de não ter sido realizada a hibridação direta entre as amostras FGA/89 e FGA/NA a5c, foi possível através de análises *in silico* (Materiais e Métodos, item 3.9.2) observar a modulação diferencial de 13 genes na infecção com a cepa neurovirulenta FGA/NA a5c em comparação com a cepa parental FGA/89 (Tabela 4.3). Nas análises *in silico*, o critério de seleção utilizado foi a modulação duas vezes maior na infecção com cepa FGA/NA a5c comparada a cepa FGA/89.

Além disso, dos genes representados na tabela 4.2, 82 apresentam-se modulados mais de duas vezes (média dos quatro dias) na infecção com a cepa FGA/NA a5c versus à infecção com FGA/89: *Irf7, Irf1, Psmb8, Psmb9, Tap1, Tap2, Lilrb4, H2-Ea, Cd74, H2-Q8, H2-Q5, H2-T9, H2-T10, H2-T22, H2-T23, Gbp1, Gbp2, Gbp4, Gbp5, Gbp6, BC057170, Mpa2l, Oas1b, Oas1g, Oasl1, Oas2, Sp110, Ifih1, Dhx58, Ddx58, Pyhin1, Ifi205, Bcl2a1c, Lgals9, Lgals3bp, Siglec1, Cd274, Igtp, Mx1, Mx2, Gvin, ligp2, ligp1, Ifi204, Isg20, Ccl5, Ccl12, Cxcl10, H2bf/Cfb, C2, C1r, Serpina3g, Zc3hav1, Rsad2, Ifi44, Ifi27, Ifi47, Ifi202b, Ly6a, Herc5, Usp18, Ms4a6b, Tor3a, Cybb, Parp14, Parp12, BC013672, 4930599N23Rik, Mlkl, Zbp1, Slnf2, Epsti1, D14Ertd668e, Phf11, 0610037M15Rik, 9830115L13Rik, A630077B13Rik, Gp49a, Drlid, H2-T17, Rnf213.*

Além destes, outros 13 genes passaram pelo critério de seleção, e mostraram-se modulados mais de 2 vezes e 30% de FDR (Figura A2.5) apenas na infecção com a cepa FGA/NA a5c. No entanto, não se pode dizer que estes genes não se encontram modulados na infecção com a cepa parental (FGA/89), apenas que, ao contrário do observado na infecção com a cepa neurovirulenta não preencheram os critérios de seleção. Adicionalmente, outros dois genes (*Ccl4* e *Cxcl9*) foram considerados diferencialmente expressos na infecção com a cepa FGA/NA a5c em comparação com a cepa parental, por terem apresentado uma forte modulação de sua expressão no 8° dpi, apesar de não atenderem ao critério de seleção de 2 vezes mais modulados e 30% de FDR (Figura A2.6).

A avaliação por qPCR de 5 destes genes, que codificam para quimiocinas, como a *Ccl5, Ccl4, Cxcl10, Ccl12* e *Cxcl11*, por qPCR (Figura 4.24) demonstra claramente que os animais infectados com a cepa FGA/89 também modulam a

expressão destes genes, especialmente no 8º dpi, no entanto, abaixo do critério de seleção de duas vezes mais expresso. Para uma análise mais precisa, todos os 13 genes selecionados como diferencialmente expressos na infecção com a cepa FGA/NA a5c (mais o *Ccl4* e o *Cxcl9*) serão quantificados por qPCR.

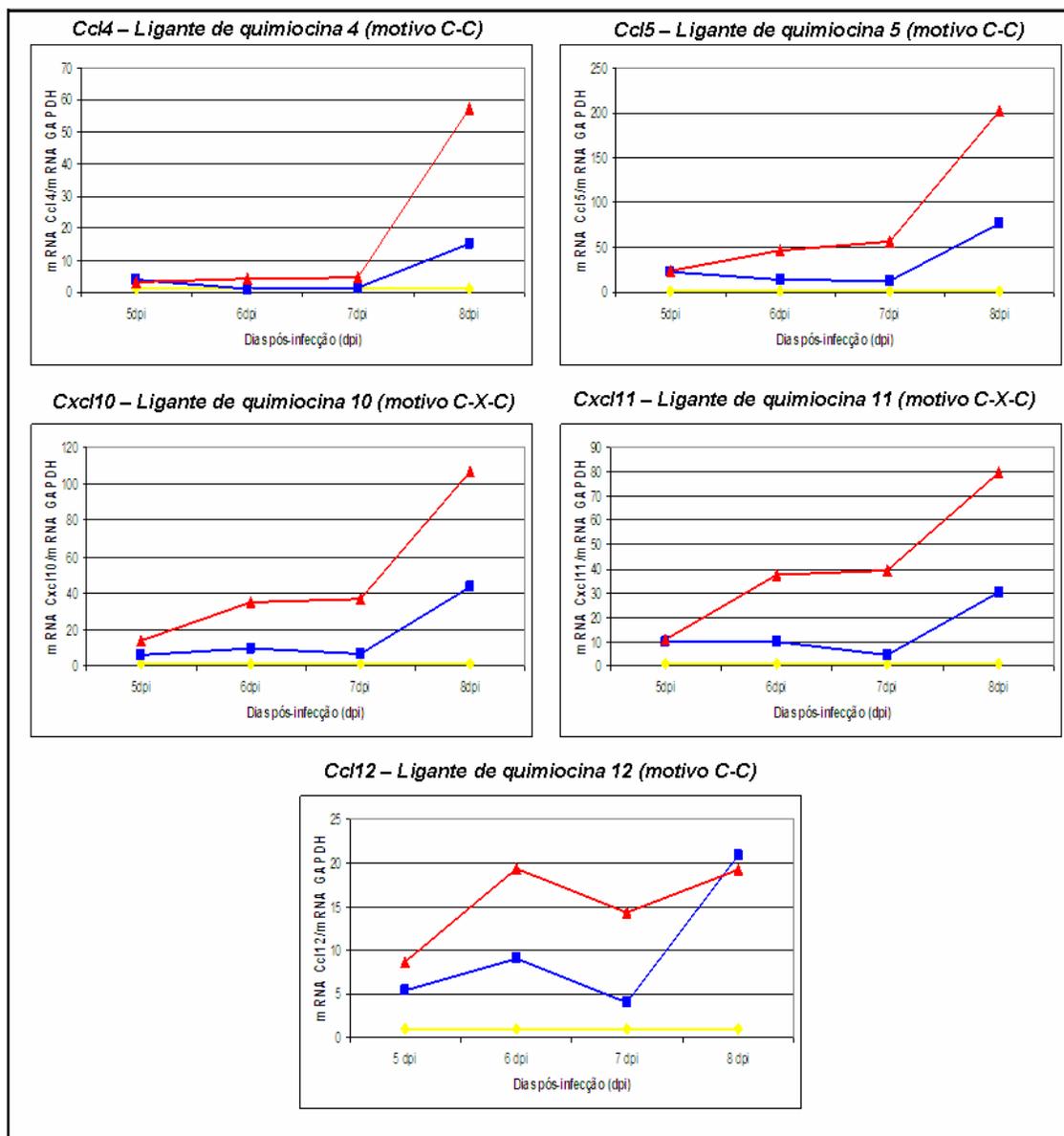


Figura 4.24: Quantificação da modulação dos genes de quimiocinas do tipo C-C e C-X-C no SNC murino. Modulação da expressão de genes de quimiocinas (*Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl12*, *Cxcl11*, *Cxcl13*) no SNC de camundongos suíços infectados com as cepas FGA/89 (azul), FGA/NA a5c (vermelho) e *mock* (amarelo) em 5, 6, 7 e 8 dpi. Ver cálculo dos valores no item 3.10 de Materiais e Métodos.

Tabela 4.3: Genes modulados na infecção com a cepa FGA/NA a5c em comparação com a cepa FGA/89.

Função Geral	Função Específica	Processo Biológico	Símbolo do Gene	Entrez GeneID	Descrição	FGA/NA a5c x FGA/89			
						5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi
Resposta Imune	Apresentação de antígeno via MHC I Receptor	Ligação à proteína	H2-D1	14964	H2-D1, histocompatibility 2, D region locus 1	9.4	10.6	4.8	7.9
		Ligação a RNA dupla-fita	Tlr3	142980	Tlr3, toll-like receptor 3	1.7	3.6	2.3	3.9
	Citocinas/ Quimiocinas	Quimiotaxia	#Ccl4	20303	Chemokine (C-C motif) ligand 4	-2.4	3.4	3.5	7.1
			#Cxcl9	17329	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-2.0	1.1	2.4	4.5
			Cxcl11	56066	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	1.0	2.8	2.5	4.4
	Ligação a GTP	Atividade GTPase	Cxcl13	55985	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	1.2	5.9	2.3	5.5
			Tgtp	21822	T-cell specific GTPase	2.3	5.4	5.6	5.9
			Gzma	14938	granzyme A	1.1	7.1	2.8	6.3
			NC	Clec4a3	73149	C-type lectin domain family 4, member a3	-2.3	3.7	1.9
	Metabolismo	Inibidor de endopeptidase	NC	Serpina3f	238393	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3F	-2.7	4,7	2,9
Mobilidade celular			Sell	20343	selectin, lymphocyte	1.5	1.3	1.9	7.7
Ligação a proteína		Metabolismo de colesterol	Ch25h	12642	cholesterol 25-hydroxylase	1.0	2.0	1.6	6.2
Atividade catalítica		Transporte de elétrons	Xdh	22436	xanthine dehidrogenase	1.2	1.8	1.4	6.6
Atividade de desidrogenase			NC	9530028C05	330256	Proteína hipotética	2.2	4.4	1.9
NC	NC	NC	Sifn4	20558	Schalfen4	-2.3	2.2	2.0	4.7

* NC: Não classificados

Genes que não atenderam o critério de seleção, porém, foram considerados diferencialmente expressos em virtude da forte modulação de sua expressão no 8° dpi.
1. Classificação funcional dos genes foi realizada utilizando-se os bancos de dados Entrez Gene (www.ncbi.nih.gov) e Gene Ontology (www.geneontology.org).

5. Discussão

5.1 Caracterização Biológica das Cepas Virais

Os relatos iniciais de encefalite pelo vírus da dengue datam de 1969, quando Myers et al. e Sarkar et al., descreveram os primeiros casos de encefalite em pacientes com dengue. Posteriormente, vários outros autores descreveram casos de desordens neurológicas associadas à infecção pelo vírus da dengue, inclusive no Brasil (SUMARMO et al., 1978; PATEY et al., 1993; MIAGOSTOVICH et al., 1997). Recentemente, os casos de encefalite associados ao vírus da dengue têm aumentado. Existem dois possíveis mecanismos que podem ser responsáveis pela doença neurológica desencadeada pelo vírus da dengue, o primeiro indireto, decorrente de um dano sistêmico, e o segundo, pela ação direta do vírus no SNC, causando encefalite (RAMOS et al., 1998). O vírus da dengue possivelmente atravessa a barreira hematoencefálica e infecta as células nervosas causando sintomas de encefalite. Chaturvedi et al. (1991) utilizando um modelo murino demonstraram a habilidade do vírus da dengue em cruzar a barreira hematoencefálica, provavelmente pela secreção de uma citocina denominada fator citotóxico (CF), produzida durante a infecção. Recentemente foi demonstrado que uma parcela significativa de pacientes com manifestações neurológicas da dengue apresenta vírus circulante no líquido e não no soro. Este resultado indica que o vírus pode cruzar ativamente a barreira hematoencefálica e replicar no SNC de humanos (DOMINGUES et al., 2007).

Dèspres et al. (1998), utilizaram um modelo murino com o intuito de estudar os marcadores moleculares envolvidos na aquisição do fenótipo de neurovirulência do vírus da dengue. Os autores geraram duas variantes neurovirulentas, FGA/NA d1d e FGA/NA a5c, através de seis passagens sucessivas e seriadas de um DENV-1(FGA/89) em cérebro de camundongos suíços recém-nascidos e células AP61 de *Aedes pseudocutellaris*. Os determinantes genéticos potencialmente responsáveis pela neurovirulência foram mapeados na proteína de envelope (E) e domínio helicase da

proteína NS3 para a cepa FGA/NA d1d (DUARTE DOS SANTOS et al., 2000). O provável mecanismo sugerido como responsável pela neurovirulência do vírus FGA/NA d1d seria a intensa apoptose observada em neurônios corticais e do hipocampo, quando comparado à infecção com a cepa FGA/89. Experimentos em células de neuroblastoma murino (N2A) confirmaram esta hipótese. No entanto, a infecção de células N2A com a cepa parental (FGA/89), e a neurovirulenta (FGA/NA a5c), não se mostrou diferente (em quantidade de células infectadas), o que corrobora nossos resultados de infecção em culturas primárias de células NP e MPC (Figura A2.1 e A2.2; DÈSPRES et al., 1998).

No entanto, os experimentos de cinética de infecção em camundongos suíços realizados *in vivo*, demonstraram que nos animais infectados com a cepa neurovirulenta FGA/NA a5c há replicação e produção de partículas virais infectivas em taxas maiores do que nos animais infectados com a cepa parental FGA/89 (3,7 e 19,2 vezes, respectivamente; Figura 4.1B e C). Além disso, animais infectados com a cepa FGA/NA a5c mostram sinais de encefalite por volta do dia 10 pós-infecção e sucumbem à infecção no dia $13,1 \pm 2,2$ (média \pm desvio padrão) pós-infecção. Estes resultados estão de acordo com os obtidos previamente por Dèspres et al. (1998). No entanto, ao contrário do observado por estes autores, foi possível observar tanto replicação quanto produção de partículas virais infectivas nos animais infectados com a cepa FGA/89. Este resultado discordante se deve, provavelmente, a diferenças no limite de detecção das técnicas empregadas em ambos os estudos para medir a replicação e a progênie viral.

Apesar de haver replicação viral nos animais infectados com a cepa FGA/89, nenhum sinal de encefalite foi observado até o final do experimento (21 dpi). Os animais infectados com a cepa FGA/89 mostraram uma importante redução na replicação e na produção de partículas virais infectivas no 15° dpi. A partir do 30° dpi, a replicação viral e a produção de partículas virais infectantes não foi mais detectada no SNC murino, sugerindo um papel da resposta imune inata em controlar a infecção (NAVARRO-SÁNCHEZ, DESPRÈS e CEDILLO-BARRÓN, 2005). A habilidade da cepa neuroadaptada FGA/NA a5c em replicar em altas taxas, e produzir elevados níveis de

partículas virais infecciosas, pode causar danos irreversíveis nas células do SNC, particularmente neurônios, o que explicaria a neurovirulência da cepa FGA/NA a5c.

Para avaliar esta hipótese, foram realizadas análises histológicas do SNC dos animais infectados. Os dados demonstraram que os animais infectados com a cepa FGA/NA a5c sofrem um extenso dano no SNC, caracterizado por encefalite e leptomeningite (Figura 4.6). Solomon et al. (2000) demonstraram que a encefalite é a manifestação clínica mais freqüentemente encontrada em pacientes com manifestações neurológicas induzidas pelo vírus da dengue. Ao contrário, animais infectados com as cepas FGA/89 e BR/01-MR não apresentaram sinais clínicos e histológicos de encefalite, apesar de apresentarem leptomeningite. Chotmongkol e Sawanyawisuth (2004) demonstraram esta apresentação em um paciente infectado com dengue. Nossos dados sugerem que as cepas neuroadaptadas apresentam uma maior habilidade replicativa no SNC, causando um extensivo processo inflamatório no córtex neuronal e hipocampo. Ao contrário, cepas não-neurovirulentas, replicam com menor eficiência (FGA/89) ou mesmo não replicam (BR/01-MR), não desencadeando sinais de doença, apesar de serem capazes de induzir a formação de leptomeningite.

Um outro ponto de interesse é a susceptibilidade ou não dos neurônios à infecção pelo vírus da dengue. O vírus da dengue possui um grande número de células-alvo, que sustentam com maior ou menor eficiência sua replicação. Foi demonstrado que vários tipos de células humanas são susceptíveis à infecção pelo vírus da dengue como células dendríticas (DCs), monócitos/macrófagos, células B e T, hepatócitos, células endoteliais e células neuronais (ANDERSON, 2003). No entanto, Clyde, Kyle e Harris (2006) sugerem que dados mais conclusivos são necessários para demonstrar se hepatócitos, células endoteliais, linfócitos e neurônios são realmente alvos da infecção pelo vírus da dengue. Nossos resultados demonstram que neurônios murinos (NP e N2A) suportam com eficiência a replicação do vírus da dengue.

As análises imunohistoquímicas sugerem que os neurônios murinos são as únicas células-alvo da infecção no SNC de camundongos. Estas análises demonstraram ainda, que os neurônios do córtex temporal e do hipocampo são os mais afetados pela infecção (Figura 4.7 e 4.8), o que está de acordo com os resultados previamente obtidos por Dèspres et al. (1998) para a cepa neuroadaptada FGA/NA d1d.

Imbert et al. (1994) demonstraram, através de ensaios de imunomarcacão dupla, que apenas neurônios são infectados pelo vírus da dengue sorotipo 2. Adicionalmente estes autores demonstraram que cepas neurovirulentas de DENV-2, como a cepa NGC, replicam com uma eficiência até 100 x maior que cepas não neurovirulentas. Apesar de não terem sido observadas células gliais infectadas nas análises de imunohistoquímica, experimentos *in vitro*, utilizando-se uma linhagem de células de glioma de ratos, como a C6, demonstraram que estas células também são alvos da infecção pelo vírus da dengue (Figura 4.4).

Em nosso estudo não foi possível demonstrar diferenças significativas na replicação e progênie viral quando culturas de células NP e MPC foram infectadas com as cepas FGA/89, BR/01-MR e FGA/NA a5c. Dèspres et al. (1998) demonstraram que as taxas de infecção de células N2A, com a cepa parental (FGA/89) e neurovirulenta (FGA/NA d1d), não diferiam. No entanto, a apoptose induzida nas células N2A infectadas com a cepa FGA/NA d1d era nitidamente mais intensa que a induzida pela cepa FGA/89. A maior taxa de apoptose observada nestas células, segundo Dèspres et al. (1998) deve-se a maior síntese protéica, em especial da proteína E, induzida pela cepa neurovirulenta. Estes dados estão de acordo com o observado em nossos experimentos, onde foi possível se observar um sinal de imunofluorescência mais intenso nas células NP infectadas com a cepa FGA/NA a5c, do que com as cepas FGA/89 e BR-01/MR (Figura 4.2).

De forma diversa, os dados dos experimentos *in vivo*, deixam claro que a cepa FGA/NA a5c infecta um número maior de células, do que a cepa FGA/89 (Figura 4.7 e 4.8), o que corrobora os resultados de replicação e progênie viral no SNC (Figura 4.1B e C), bem como, os dados *in vivo*, previamente obtidos por Dèspres et al. (1998).

5.2 Caracterização Molecular das Cepas Virais

Vários autores demonstraram que uma única alteração de aminoácidos no genoma de flavivírus pode ser responsável por induzir diferenças fenotípicas

importantes. Lui et al. (2006) caracterizaram uma única alteração de aminoácido na proteína NS2A do WNV, que faz com que a proteína perca a habilidade de inibir a via de sinalização de IFN- α/β , reduzindo deste modo a virulência do vírus em modelo murino. Mandl et al. (2000) mostraram que a mutagênese sítio-dirigida em um único aminoácido na proteína E (Thr₃₁₀/Lys) do vírus da encefalite transmitida por carrapato (*Tick Borne Encephalitis*, TBE) pode atenuar o fenótipo viral. No entanto, mutações compensatórias em posições próximas podem restaurar o fenótipo virulento inicial. Outro exemplo é o aumento da infectividade em mosquitos vetores, dos vírus da encefalite eqüina venezuelana (VEEV), desencadeado por uma única mutação na proteína E do VEEV (BRAULT et al., 2004). Estes dados indicam que mutações únicas no genoma de flavivírus podem ser responsáveis por diferenças de fenótipo, afetando a replicação viral, a resposta do hospedeiro e a competência vetorial.

O seqüenciamento nucleotídico completo do genoma da cepa neurovirulenta FGA/NA a5c revelou que esta compartilha duas mutações com a cepa FGA/NA d1d (também neurovirulenta), uma na proteína E, e outra na NS3. A mutação compartilhada na proteína E é a substituição Met₁₉₆/Val, que mapeia na interface dos domínios I e II da proteína E, em uma região que provavelmente age como uma dobradiça durante as alterações conformacionais, que a proteína realiza durante o processo de fusão (DUARTE DOS SANTOS et al., 2000; REY et al., 1995). Além disso, uma mutação não-conservativa na posição 276 da proteína E (Thr/Pro) foi detectada apenas na cepa FGA/NA a5c, localizada na *kl* β -hairpin (bolsa de ligação, do inglês, *ligand-binding pocket*), podendo estar implicada no aumento da hidrofobicidade. Mutações que afetam a bolsa de ligação (resíduos 268-280 da cepa S1 do DENV-2) alteram o limiar de pH necessário para a fusão, um passo crítico no ciclo replicativo do vírus da dengue (MODIS et al., 2003).

Mutações na proteína de envelope podem aumentar a patogenicidade, bem como a neurovirulência, das infecções pelo vírus da dengue, alterando a afinidade de ligação do vírus ao(s) receptore(s) da célula hospedeira, ou ainda as propriedades fusogênicas do vírus (HASEGAWA et al., 1992; JIANG et al., 1993; McMINN, WEIR e DALGARNO, 1996). A glicoproteína E é um importante antígeno do DENV, sendo responsável por definir o tropismo-viral. Desta forma, o conhecimento dos marcadores moleculares na

proteína E que alteram a virulência (ou neurovirulência) do DENV é de fundamental relevância para compreensão da patogenia da dengue (REY, 2003).

As mutações previamente identificadas na proteína E da cepa FGA/NA d1d nas posições 365 e 405, não foram encontradas na cepa FGA/NA a5c, o que sugere que talvez possam não ser importantes no processo de neuroadaptação do DENV-1. No entanto, tem sido demonstrado que a região de alfa hélice H1^{Pred}, localizada entre os aminoácidos 400-412 da proteína E parece ser importante no fenótipo de neurovirulência. Esta região de alfa hélice é essencial para a conversão da forma solúvel de dímeros da proteína E para homotrímeros, além de ser importante na exposição transiente do peptídeo de fusão, facilitando a interação com a proteína-alvo da membrana (MODIS et al., 2004; STIASNY et al., 2005). Relatos prévios demonstram que mutações nesta região, parecem gerar um fenótipo de neurovirulência nos diferentes sorotipos do DENV, por exemplo, a mutação Phe₄₀₂/Ile no DENV-2, Phe₄₀₁/Ile no DENV-4, Phe₄₀₅/Ile no DENV-1, e Glu₄₀₁/Lys e Thr₄₀₃/Ile no DENV-3 (BRAY et al., 1998; KAWANO et al., 1993; DUARTE DOS SANTOS et al., 2000; LEE, WEIR e DALGARNO, 1997). O fato de não termos encontrado mutações nesta região na cepa FGA/NA a5c, vai contra os dados referenciados acima, no entanto, a mutação na bolsa de ligação (Met₁₉₆/Val) poderia de, algum modo, compensar a ausência da mutação na região de alfa hélice H1^{Pred}.

A proteína NS3 é uma proteína multifuncional com atividade: de serina-protease (porção amino terminal), helicase, nucleosídeo 5'- trifosfatase (NTPase) e RNA 5'- trifosfatase (RTPase). Estas atividades são de fundamental importância na replicação e *capping* do RNA viral (BENARROCH et al., 2004). O fato da mutação não-conservativa Leu₄₃₅/Ser ter sido observada em ambas as cepas neurovirulentas FGA/NA d1d e FGA/NA a5c, sugere fortemente sua participação na aquisição do fenótipo de neurovirulência em camundongos. A mutação mapeia no domínio II da porção helicase da proteína NS3, no topo da estrutura de *β-hairpin*, e desta forma, pode alterar a atividade do complexo de replicação (CR), conforme sugerido por Duarte dos Santos et al. (2000). A conexão entre os dois domínios via a estrutura de *β-hairpin* pode ser importante para a atividade NTPase/helicase da NS3, que parece mudar de conformação após hidrólise de ATP para realizar o desenovelamento do RNA viral.

As mutações localizadas na porção carboxi-terminal do domínio helicase da proteína NS3, podem também alterar a atividade de RTPase, a qual parece estar acoplada à atividade helicase, além de ser dependente do motivo conservado Walker B (BENARROCH et al., 2004). A mutação no domínio helicase da NS3 parece aumentar a habilidade replicativa da cepa neurovirulenta FGA/NA a5c. Os resultados da figura 4.1B e C, mostram uma maior replicação e produção de partículas infecciosas (3.7 e 19.2 vezes, respectivamente) da cepa FGA/NA a5c quando comparado à cepa parental (FGA/89). A intensa replicação e produção de partículas virais infectivas podem desencadear o processo de apoptose em células neuronais murinas, levando a um quadro de encefalite e morte dos animais (DÈSPRES et al., 1998; JELACHICH & LIPTON, 1996).

Os vírus de genoma RNA existem sob a forma de quasispecies, o que significa dizer que uma cepa viral é, na verdade, uma complexa mistura de genomas. Este conceito parece ser essencial para a compreensão da adaptação e sobrevivência viral, em ambientes com as mais variadas pressões seletivas (VIGNUZZI et al., 2006). As altas taxas de erro observadas para as RNA polimerases virais (10^{-3} a 10^{-5} /nucleotídeos/ciclo de replicação), e a potencial pressão seletiva para a replicação do vírus da dengue em diferentes substratos celulares, como o SNC murino, são provavelmente, os mecanismos responsáveis pelo o aparecimento de populações virais neuroadaptadas (CROTTY, CAMERON e ANDINO, 2001; DOMINGO & HOLLAND, 1997).

Uma vez que os relatos de complicações neurológicas, em casos de infecção com vírus da dengue, têm sido cada vez mais freqüentes, este modelo murino de neurovirulência de DENV-1 pode ser uma alternativa para o estudo da patogênese e do tratamento da infecção pelo DENV-1 no SNC. A identificação de marcadores moleculares em cepas de DENV responsáveis por causarem doença neurológica poderia ser utilizada para prever a emergência de formas mais severas da doença, auxiliar no manejo clínico destes pacientes (BRAULT et al., 2004), e eventualmente, identificar alvos para o delineamento de estratégias antivirais específicas. Visando validar o envolvimento destas e de outras mutações possivelmente relacionadas com o fenótipo de neurovirulência, outras cepas de DENV-1 estão sendo neuroadaptadas

(STROTMANN, 2008). Adicionalmente, as mutações identificadas estão sendo analisadas através das tecnologias de replicons e de clones infecciosos de DENV-1, recentemente desenvolvidas em nosso laboratório (SUZUKI et al., 2007).

5.3 Experimentos de Expressão Gênica

A evolução clínica de uma infecção é resultado da competição entre a resposta do hospedeiro e a habilidade do microorganismo em multiplicar-se, no caso, o vírus da dengue, e infectar novas células. A capacidade do vírus em escapar da resposta imune do hospedeiro é crucial para o desenvolvimento da doença em um hospedeiro susceptível. Após a detecção da infecção viral inicia-se nas células uma rápida e múltipla resposta antiviral mediada por IFN, visando prevenir a disseminação do vírus (PASIEKA et al., 2006).

A célula detecta a infecção através de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*), os quais, reconhecem uma grande quantidade de moléculas padrão associadas a patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), presentes nos vírus e em outros microorganismos patogênicos. O principal PAMP presente nos vírus é a molécula de RNA dupla-fita, bem como, algumas estruturas secundárias formadas por RNA simples-fita no extremo 5' do genoma de alguns vírus (HALLER, KOCHS e WEBER, 2007). Proteínas celulares, como os receptores do tipo *Toll* (TLRs), em especial o Tlr3, agem como sensores e reconhecem RNA dupla-fita, (que são formados durante a replicação de muitos vírus, incluindo o da dengue) ativando a produção de IFN e estabelecendo um estado antiviral no sítio da infecção (SHAW & PALESE, 2005; Figura 5.1).

Com o objetivo de conhecer o perfil transcricional do SNC murino após a infecção com o DENV-1 e melhor compreender as interações entre o vírus da dengue e camundongos, foram realizados experimentos de microarranjo de DNA. Para tanto, foram utilizados cepas de DENV-1 com diferentes padrões de neurovirulência: parental (FGA/89) e neurovirulenta (FGA/NA a5c). As principais vias moduladas durante a

infecção do SNC murino com o DENV-1 foram às vias de sinalização de IFN, processamento e apresentação de antígeno e ativação do complemento (Figura 4.12, Tabela 4.2 e 4.4).

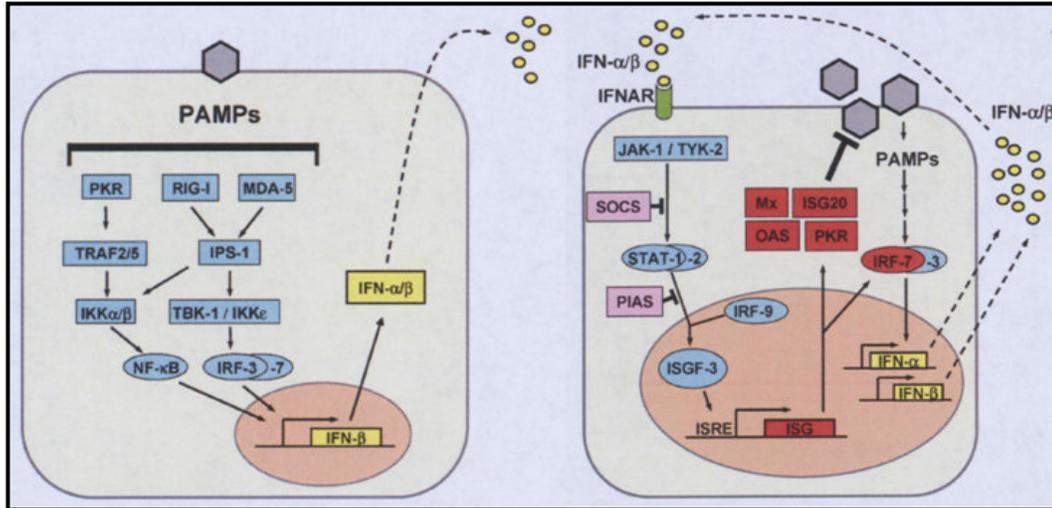


Figura 5.1: Representação esquemática do mecanismo de sinalização da via de IFN tipo I. Indução da resposta de IFN tipo I. Os PAMPs são reconhecidos intracelularmente por PRRs, ativando fatores de transcrição, como NF-κB (*nuclear factor κB*), IRF-3 (*IFN regulatory factor 3*) e AP-1 (*Activator protein 1*). A ação conjunta destes fatores se faz necessária para que ocorra a ativação do promotor de IFN-β. O fator IRF-3 é fosforilado pelas quinases TBK-1 (*TANK-binding kinase 1*) ou IKKε (*IkappaB kinase-epsilon*), que são previamente ativadas por RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene-1*) ou MDA-5 (*melanoma differentiation associated gene-5*). NF-κB é ativado via PKR (*protein kinase R*), bem como por IPS-1 (*IFN-β promoter stimulator 1*). O fator regulador de IFN 7 (*Irf7*), posteriormente aumenta a transcrição do IFN, apesar de ser também importante na ativação inicial da transcrição de IFN-β. O IFN-α e -β produzidos são secretados e ligam-se aos seus receptores específicos na superfície de uma célula vizinha. A ligação do IFN tipo I aos seus receptores induz a expressão de um grande número de ISGs (*Mx*, *Isg20*, *OAS*) através da via de sinalização da JAK/STAT. O *Irf7* posteriormente amplifica a resposta de IFN através da expressão de inúmeros subtipos de IFN-α. Modificado de HALLER, KOCHS e WEBER, 2007.

As análises do transcriptoma do SNC murino, após a infecção com as cepas parental e neurovirulenta, revelaram uma forte indução da resposta imune antiviral inata, especialmente de genes relacionados à via de IFN tipo I. Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos recentemente por, Sariol et al. (2007) em PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) infectados com DENV-1. Adicionalmente, análise da expressão gênica de células endoteliais de

cordão umbilical humano (HUVECs), infectadas com DENV-2, também demonstraram uma importante ativação de genes da via de IFN (WARKE et al., 2003).

5.3.1 Genes Estimulados por Interferon (ISGs)

Uma importante família de ISGs superexpressa no SNC dos animais infectados com as diferentes cepas de DENV-1, são os genes *2'-5'- oligoadenylated system* (2'-5'OAS), que ativam a RNase L, induzindo a degradação de RNA, e reduzindo a eficiência da replicação viral. Foi demonstrado que os genes da família 2'-5'OAS conferem resistência à infecção por flavivírus, como o vírus da hepatite C (HCV) (KNAPP et al., 2003), WNV (KAJASTE-RUDNITSKI et al., 2006; VENTER et al., 2005) e DENV (WARKE et al., 2003).

O fenótipo de resistência para doença induzida por flavivírus em camundongos é controlado por um alelo autossômico dominante (*FIV*), que foi identificado como o gene 2'-5'OAS 1b ou *Oas1b*. Camundongos susceptíveis à infecção apresentam um códon de parada prematuro na seqüência do gene *Oas1b*, produzindo uma proteína 30% menor na região carboxi-terminal, quando comparada com a proteína produzida por animais resistentes (PERELYGIN et al., 2002). Scherbik et al. (2007) demonstraram que a correção do códon de parada prematura, por técnicas de biologia molecular, recuperando a porção carboxi-terminal completa da proteína, torna os animais resistentes à infecção com a cepa vacinal de febre amarela, YF17D.

Recentemente, Malathi et al. (2007) demonstraram uma nova função dos genes da família 2'-5'OAS na resposta imune inata contra vírus. Foi evidenciado que a ativação da RNase L, via 2'-5' OAS, leva a degradação de moléculas de RNA próprias da célula, além do RNA viral. As pequenas moléculas de RNA formadas acabam por induzir a via de sinalização por IFN- β , exacerbando a resposta antiviral inata. O mecanismo pelo qual ocorre esta ativação é dependente de MDA-5 e RIG-1, além da proteína de interação IPS-1. Desta forma, além da função direta na resposta contra

vírus (degradação do RNA viral), o sistema OAS/RNase L desempenha também, um importante papel na via de sinalização por IFN- β , exacerbando sua produção (MALATHI et al., 2007).

Outro grupo de ISGs com atividade antiviral superexpressa no SNC dos animais infectados são os membros da família de proteínas de resistência a mixovírus (Mx). Estas proteínas pertencem a uma família de GTPases induzidas por IFN tipo I, que exercem seus efeitos antivirais interferindo na tradução das proteínas virais, ou ainda bloqueando o tráfego do nucleocapsídeo viral durante a montagem das novas partículas virais (WARKE et al., 2003; KOCHS & HALLER, 1999). A deleção do gene *Mx1* (*Mx1*^{-/-}) em camundongos torna-os susceptíveis à infecção com o vírus influenza H5N1, e com o vírus influenza causador da pandemia de 1918, enquanto que altos níveis de resistência foram observados em animais do tipo selvagem, isto é, portadores do gene *Mx1* (*Mx1*^{+/+}) (TUMPEY et al., 2007).

Warke e colaboradores (2003) demonstraram que os genes *Mx1*, *Mx2* e *MxA* estão superexpressos em células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC) infectadas com DENV-2. Adicionalmente, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de macacos Rhesus infectadas com DENV-1 também apresentam um aumento na expressão dos genes *Mx1* e *Mx2* (SARIOL et al., 2007). Em nossas análises, camundongos suíços infectados com ambas as cepas do DENV-1 superexpressaram o gene *Mx1* e *Mx2* (Tabelas 4.2 e 4.3, Figura 4.15), e em maiores níveis nos animais infectados com a cepa FGA/NA a5c.

Recentemente, um estudo sobre o perfil de expressão gênica do sangue total de pacientes com SCD e com FHD, demonstrou a redução na expressão de 24 ISGs com atividade antiviral e de imunoregulação, nos pacientes com SCD. Dentre os genes com expressão reduzida encontrou-se o *Mx1* e o *ISG15* (ver adiante). A expressão reduzida de ISGs pode ser causada por fatores genéticos do hospedeiro, ou ainda por fatores virais, como por exemplo, a capacidade de inibir a via de sinalização por IFN que algumas proteínas virais apresentam, como a NS4B (SIMMONS et al., 2007; MUNOZ-JORDAN, et al., 2005). Este foi o primeiro trabalho que sugere um padrão de resposta gênica associada a maior risco de doença grave por DENV, e em especial uma

importante contribuição da resposta imune inata na determinação do grau de severidade da infecção pelo vírus da dengue.

Outro ISG modulado em nossos experimentos de infecção com as cepas de DENV-1 com diferentes padrões de virulência foi o fator de iniciação de tradução eucariótica 2-alfa quinase 2 (Eif2ak2, do inglês, *Eucarotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2*), previamente designado como PrKR (do inglês, *Kinase protein dependent of double strand RNA*) (Tabela 4.2). Este gene é capaz de bloquear a tradução, bloqueando os sítios de ligação do RNA viral aos ribossomos (DIAMOND & HARRIS, 2001). Sariol et al. (2007) demonstraram a modulação na expressão deste gene em PBMCs de macacos Rhesus infectados com DENV-1. Alternativamente, foi demonstrado que o IFN é capaz de inibir a infecção pelo DENV, prevenindo a tradução do RNA viral através de mecanismos independentes de PrKR (DIAMOND & HARRIS, 2001).

Apesar da modulação dos genes de IFN- α e - β não ter sido detectada em nossos experimentos de microarranjos, os resultados de qPCR, confirmaram a expressão do gene de IFN- β e, em menor escala do IFN- α , no SNC de camundongos infectados com ambas as cepas de DENV-1 (Figura 4.22). O fato de não termos observado a modulação dos genes para IFN- α e - β nos microarranjos se deve provavelmente ao modelo utilizado no estudo: análise de tecido e não de culturas celulares, o que acaba reduzindo a sensibilidade da técnica de microarranjo. A escolha deste modelo tem como base o fato de que as mudanças no perfil de expressão de mRNA em resposta a vírus que infectam populações celulares não renováveis, como os neurônios, é melhor estudada no hospedeiro intacto, do que em culturas celulares, uma vez que o micro-ambiente natural da infecção é melhor preservado (VENTER et al., 2005).

Outro ponto importante que pode explicar a baixa expressão no gene do IFN- α , é que sua modulação ocorre nos primeiros momentos da infecção, o que poderia explicar o resultado negativo observado nos experimentos de microarranjo, bem como, seu baixo valor no qPCR. Adicionalmente, baixos níveis de IFN- α e - β são capazes de induzir uma forte estimulação de ISGs com atividade antiviral (BOURNE et al., 2007; JOHNSTON et al., 2001; SARIOL et al., 2007). Em paralelo com nossos achados,

outros autores observaram a expressão de ISGs, em células hepáticas de chimpanzés infectadas com HCV e PBMC de macacos Rhesus infectados com DENV-1, sem no entanto, detectar mRNA para IFN- α e - β (SARIOL et al., 2007; BIGGER et al., 2004). Um outro fato que pode contribuir para explicar a não detecção da expressão de genes de INF tipo I é que recentemente foi verificado que a sonda para INF- β presente nos microarranjos utilizados apresentava problemas (Dr. Paul Fawcett, comunicação pessoal).

5.3.2 Processamento e Apresentação de Antígenos

O processamento de antígenos e sua apresentação a linfócitos T via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), é um processo de extrema importância na geração de resposta imune adaptativa. Nossos experimentos demonstraram a modulação de genes responsáveis pelo processamento de antígenos no imunoproteossomo (*Psm8* e *Psm9*), transporte de antígenos ao retículo endoplasmático (*Tap1* e *Tap2*) e na apresentação dos antígenos na superfície celular por MHC classe I e II (Tabela 4.2 e Figura 4.17 e 4.18). Proteínas de baixo peso molecular induzidas por IFN- γ e codificadas por genes do MHC (*Psm8* e *Psm9*, ou seus homólogos humanos *LMP2*, *LMP7* e *LMP10*), participam na formação do imunoproteossomo. Este sistema de degradação de proteínas apresenta diferentes especificidades de substrato, comparado ao proteossomo, estando mais envolvido no processamento de antígenos para apresentação via MHC (VAN DEN EYNDE & MOREL, 2001; GROETTRUP et al., 1996). A formação do imunoproteossomo foi observada em neurônios em algumas desordens degenerativas, como na doença de Huntington (DIAZ-HERNANDEZ et al., 2003), Esclerose Lateral Amiotrófica (CHERONI et al., 2005) e na doença de Alzheimer (MISHTO et al., 2006).

A expressão de moléculas de MHC classe I é baixa no SNC intacto, e apresenta-se confinada aos vasos sanguíneos (GEHRMANN et al., 1991 e 1993; VASS & LASSMANN, 1990). As moléculas do MHC classe II são frequentemente encontradas

em macrófagos meningeais e do plexo coriáide, e em células perivasculares (GEHRMANN, MONOCO e KREUTZBERG, 1991; GEHRMANN et al., 1993; GEHRMANN, MATSUMOTO e KREUTZBERG, 1995; GRAEBER, STREIT e KREUTZBERG, 1989; GRAEBER et al., 1992; HICKEY & KIMURA, 1998; HICKEY et al., 1992; VASS & LASSMANN, 1990). Adicionalmente, as moléculas de MHC classe II parecem ser constitutivamente expressas em uma sub-população de células da micróglia residente (STREIT, GRAEBER e KREUTZBERG, 1989).

O SNC foi sempre considerado um sítio imuno-privilegiado, onde o espectro e a magnitude das respostas imunes devem ser estritamente regulados, visando limitar danos. Os dados que mostram a modulação da via de apresentação de antígenos (MHC I e II) no SNC de camundongos infectados com DENV-1, podem ser explicadas por três hipóteses principais: a expressão ocorrendo em neurônios infectados; expressão por células “acessórias”, como a micróglia, oligodendrócitos e células endoteliais, induzida por citocinas (IFN I) secretadas por neurônios infectados; ou ainda, por células periféricas que infiltram no SNC em processo inflamatório.

Classicamente, neurônios não participam do processamento e apresentação de antígenos, e são geralmente incapazes de expressar moléculas de MHC em sua superfície (GOGATE et al., 1996; JOLY & OLDSTONE, 1992). No entanto, foi recentemente demonstrado que durante infecções agudas com o vírus da hepatite murina (MHV), moléculas de MHC classe I são expressas *in vivo*, por neurônios, oligodendrócitos, micróglia e células endoteliais, e que moléculas de MHC classe II são expressas apenas por células microgliais. Estes dados indicam que neurônios têm o potencial de apresentar antígenos às células T, e desta forma, serem eliminados através da interação com linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos (REDWINE, BUCHMEIER e EVANS, 2001).

Foi recentemente demonstrado que a expressão de genes *LMP*, que formam o imunoproteosomo, pode ser induzida em neurônios murinos após a estimulação com IFN- γ (YANG, TUGAL e REISS, 2006). Adicionalmente, o IFN tipo I (IFN- α/β) é também capaz de induzir a formação do imunoproteosomo em células de hepatoma humano transfectadas com o RNA de HCV, e no fígado de chimpanzés infectados com HCV, muito antes da detecção do IFN tipo II (IFN- γ ; SHIN et al., 2006). Além disso, algumas

citocinas, como o IFN- γ e o TNF- α podem induzir a expressão de moléculas de MHC classe II na superfície de astrócitos (VASS & LASSMANN, 1990), sugerindo que citocinas produzidas por células infectadas, podem desencadear a transcrição de genes em células “acessórias”, como micróglia, oligodendrócitos, entre outras.

Finalmente, foi demonstrado, através de análises histológicas, que os animais infectados com as cepas FGA/89, e mais acentuadamente, com a cepa FGA/NA a5c, apresentaram infiltrado inflamatório importante. Este infiltrado constituído aparentemente por linfócitos e macrófagos de origem periférica, podem ser os responsáveis pela expressão de genes do MHC no SNC dos animais infectados. Os animais infectados com a cepa FGA/89 apresentaram uma leptomeningite linfohistiocítica, sem encefalite, ao contrário dos animais infectados com a cepa neurovirulenta FGA/NA a5c, que apresentam encefalite com infiltrado inflamatório importante (BORDIGNON et al., 2007). Deste modo, a maior expressão dos genes MHC nos animais infectados com a variante FGA/NA a5c poderia ser explicada pela maior presença de células inflamatórias periféricas. Na encefalomielite murina, induzida após a infecção com o vírus Theiler, a maior parte das células que expressam MHC classe II nos pontos de lesão da medula espinhal, são macrófagos periféricos que infiltram o SNC inflamado (POPE et al., 1998).

Para definir quais as células do SNC, expressam as moléculas envolvidas no processamento e apresentação de antígenos, são necessários estudos mais aprofundados, como ensaios de co-localização com anticorpos, imunomarcção para análise por citometria de fluxo, entre outros. No entanto, os experimentos de microarranjo deixam claro, que existe a ativação da via de processamento e apresentação de antígeno no SNC de camundongos suíços infectados com ambas as cepas de DENV-1.

5.3.3 Sistema Complemento

O sistema complemento (SC) é uma família de mais de 30 proteínas e receptores de superfície celular, que reconhecem PAMPs, ligantes próprios alterados, ou ainda complexos imunes (CARROLL, 2004). O SC é um importante mecanismo de defesa imune inata, eliminando patógenos diretamente, através da formação de poros, ou indiretamente, pela opsonização e recrutamento de macrófagos. O SC é especialmente importante no cérebro, em virtude do limitado acesso dos componentes do sistema imune adaptativo (linfócitos T) a este tecido, devido à presença da barreira hemato-encefálica (SPETH et al., 2002).

Praticamente todas as células presentes no SNC são capazes de sintetizar proteínas do sistema complemento. A ativação do sistema complemento no SNC contribui para o desenvolvimento de um estado inflamatório localizado, que em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, esta correlacionada com as disfunções cognitivas (RUS et al., 2006). No entanto, recentemente, tem sido sugerido que alguns componentes do sistema complemento poderiam ter efeitos neuroprotetores, através da eliminação de depósitos amilóides, e de neurônios degenerados, presentes em processos inflamatórios do SNC. Desta forma, o sistema complemento reduz a inflamação induzida pela presença destes depósitos e de neurônios degenerados no SNC, podendo ter um efeito também neuroprotetor (RUS et al., 2006).

Speth et al. (2002) demonstraram a expressão de C3 em astrócitos e neurônios infectados com o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), sugerindo que o sistema complemento pode ser relevante na demência induzida pelo HIV. Níveis elevados das proteínas C3 e C4 foram encontrados no líquido de pacientes soropositivos para HIV-1 com desordens neurológicas, o que reforça a hipótese da participação do SC em processos neurodegenerativos (JONGEN et al., 2000).

A participação do SC na patogênese da dengue foi proposta a mais de 30 anos, em 1973, quando foi sugerido que a ativação do sistema complemento poderia ser um evento chave no desenvolvimento da FHD/SCD (BOKISH et al., 1973). O sistema

complemento pode ser ativado pela proteína NS1 (solúvel ou associada a membranas celulares) do vírus da dengue e potencializado por anticorpos contra a proteína NS1, ocasionando a formação local e sistêmica de anafilatoxinas (C3a e C5a) e do complexo de ataque à membrana SC5b-9, ou MAC. Os níveis plasmáticos de NS1 e do complexo SC5b-9 de 163 pacientes com dengue mostraram correlação com a severidade da doença. Foram detectados elevados níveis de NS1, anafilatoxina C5a e complexo de ataque à membrana SC5b-9, em pacientes com SCD, comparado aos pacientes com formas mais brandas da doença. Deste modo, a ativação do sistema complemento na infecção pelo DENV pode contribuir para a patogênese do extravasamento vascular observado na FHD (AVIRUTNAN et al., 2006). Contrariamente, foi recentemente demonstrado que a proteína do complemento C1q pode restringir o efeito dos anticorpos potencializadores da infecção (ADE), por anticorpos anti-dengue. O efeito, no entanto, parece ser restrito para as sub-classes de anticorpos do tipo IgG que se ligam avidamente a proteína C1q, reduzindo deste modo a magnitude do fenômeno de ADE, tendo um papel protetor na infecção pelo vírus da dengue (MEHLHOP et al., 2007).

Mehlhop & Daimond, (2006) demonstraram um papel importante da ativação do sistema complemento na proteção e estimulação da resposta imune adaptativa durante a infecção pelo WNV. Camundongos deficientes em proteínas do complemento, como C1q, C4 e fator B ou D, apresentaram maiores taxas de mortalidade quando desafiados por WNV, sugerindo que todas as vias de ativação do complemento (clássica, alternativa e de lectinas) funcionam conjuntamente para limitar a infecção pelo WNV. Deficiências na via alternativa de ativação do complemento, ocasionam uma demora na eliminação do WNV, além de gerar uma resposta diminuída de células T. Deficiências nas vias clássica e de lectinas estão associadas à redução da infecção no baço e a falhas nas respostas de células B e T contra o WNV.

Os dados dos experimentos de microarranjo mostraram a modulação da expressão de genes da via de complemento (C1q, C1r, C2, C4 e fator Bf; Tabela 4.2, Figura 4.20) no SNC de camundongos suíços infectados com ambas as cepas de DENV-1 (parental e neuroadaptada). Os níveis de modulação foram maiores nos animais infectados com a cepa neurovirulenta FGA/NA a5c. Finalmente, o papel

protetor (redução da carga viral) ou deletério (lise celular), da ativação do sistema complemento no SNC murino infectado pelo DENV-1, precisa ainda ser melhor definido.

5.3.4 Via de Ubiquitinação

Os experimentos de microarranjo demonstraram a expressão de genes envolvidos na via de ubiquitinação. No entanto, uma análise mais cuidadosa, demonstrou que na verdade a maior parte dos genes modulados nesta via fazem parte de um processo celular conhecido como *protein ISGylation*, uma via funcionalmente semelhante à de ubiquitinação clássica. Recentemente, a via de *protein ISGylation* foi descrita como sendo importante nos mecanismos de resposta imune inata contra infecções virais, especialmente contra os vírus da Influenza tipo B (YUAN & KRUG, 2001), vírus da coriomeningite linfocitária (LCMV) da estomatite vesicular (VSV) (RITCHIE et al., 2004), vírus Sindbis (LENSCHOW et al., 2005) e HIV-1 (OKUMURA et al., 2006). Adicionalmente, esta via desempenha um papel fundamental para o desenvolvimento fetal, sendo que animais *knockout* para o gene *Usp18*, apresentam morte fetal relacionada ao desequilíbrio da *protein ISGylation* nos sítios de implantação dos fetos no útero (REMPEL et al., 2007).

A proteína ISG15, que possui uma seqüência de aminoácidos consideravelmente homóloga à ubiquitina é conjugada a proteínas-alvo. Para tanto, participam da via uma enzima ativadora de ubiquitina, conhecida como UBE1L (YUAN & KRUG, 2001), uma enzima conjugadora, a UBE2L6 (KIM et al., 2006) e uma enzima “desconjugadora” de ubiquitina (DUB), como a *Usp18*, também conhecida como UBP43 (MALAKHOV et al., 2002). Ao contrário do que ocorre na via clássica de ubiquitinação, a conjugação da proteína ISG15 a proteínas-alvo não as direciona para degradação. Todas as enzimas e proteínas supracitadas mostraram-se moduladas no SNC de camundongos infectados com ambas as cepas de DENV-1 (Figura 4.21).

Ritchie et al. (2004) demonstraram que animais deficientes em *Usp18* (*Usp18*^{-/-}) eram mais resistentes à infecção letal com os vírus LCMV e VSV. A sobrevivência dos

animais *Usp18*^{-/-} infectados com LCMV está relacionada a uma severa inibição da replicação viral e da expressão dos antígenos virais no SNC. Além disso, a expressão reduzida dos antígenos virais do LCMV no SNC dos animais, não se mostrou dependente de linfócitos T CD8⁺, sugerindo o envolvimento da imunidade inata como principal responsável pelo efeito antiviral. Adicionalmente, observou-se um grande aumento na taxa de *protein ISGylation* no animais *Usp18*^{-/-}, processo semelhante à ubiquitinação de proteínas alvos. A proteína tipo-ubiquitina ISG15 encontra-se altamente induzida após estimulação por IFN e durante infecções virais e bacterianas. Poucos são os alvos da *protein ISGylation* até o momento conhecidos, como JAK1, STAT1, SERPIN2a, PLCγ1 e ERK1/2. Uma vez que JAK1 e STAT1 estão diretamente envolvidas na transdução de sinal da via de IFN e de outras citocinas (IFN-γ, IL-6 e IL-12), a modificação por ISG15 destas proteínas poderia ter um papel importante na via de sinalização por IFN (RITCHIE et al., 2004). Até o momento, não se conhece o significado biológico desta modificação nas proteínas alvo.

Malakhova et al. (2006) demonstraram que a proteína de “desconjugação”, *Usp18* (UBP43) é capaz de se ligar ao receptor IFNAR2, no mesmo domínio (Box1 e Box2) em que este interage com a quinase do tipo Janus (JAK1). Desta forma, a proteína *Usp18* bloqueia toda a via subsequente de ativação de IFN, reduzindo sua expressão e conseqüentemente, sua resistência a infecções virais. Assim sendo, a *Usp18* funciona como uma reguladora negativa da via de IFN, sendo importante no controle das respostas mediadas por IFN, e auxiliando na manutenção da homeostasia.

Estes resultados apontam para uma aplicação terapêutica importante da enzima de “desconjugação” *Usp18*, uma vez que sua inibição pode ocasionar um aumento na resposta mediada por IFN, aumentando a proteção inata contra doenças infecciosas, conforme já demonstrado por Ritchie et al., (2004).

Além disso, esta via exerce um papel fundamental na função cerebral. Animais *knockout* para o gene *Usp18*, apresentam elevados níveis de proteínas conjugadas com ISG15 no cérebro, ocasionando necrose na região ependimária, e o rompimento da barreira hematoencefálica. O rompimento desta barreira resulta em desordens neurológicas severas, o que caracteriza a importância desta via na manutenção da homeostase e correta função cerebral (RITCHIE et al., 2002).

Recentemente, um outro mecanismo de atividade antiviral desta via foi proposto. Okumura et al. (2006) demonstraram que células infectadas com HIV-1, na presença de plasmídeos que expressam a proteína ISG15, apresentam uma redução na replicação viral, comparada às células infectadas sem o plasmídeo. Adicionalmente, a replicação é completamente bloqueada, se além da expressão de ISG15 houver também a expressão da enzima ativadora UBE1L. Contrariamente, a expressão da enzima de desconjugação *Usp18* recupera parcialmente a produção de partículas virais infectantes do HIV-1. Os autores demonstraram ainda que o possível mecanismo antiviral desta proteína seria a inibição da interação entre as proteínas Gag e Tsg101, essenciais para o brotamento do HIV-1 da célula infectada.

Os genes desta via estão também modulados na infecção com os vírus da hepatite C e da dengue, em chimpanzés e macacos Rhesus, e em camundongos infectados com WNV, todos pertencentes à família *Flaviviridae* (SARIOL et al., 2007; BIGGER et al., 2004). Recentemente, Warke et al. (2008) mostraram a superexpressão do gene *Usp18* em células HUVECs, monócitos e células B humanas infectadas com DENV-2. Nossos resultados estão desta forma, de acordo com o descrito na literatura, que demonstram a modulação positiva da expressão deste gene em resposta a infecções virais. No entanto, a importância desta via na infecção pelo vírus da dengue precisará ser caracterizada em ensaios funcionais.

5.4 Diferenças na modulação da expressão gênica entre os animais infectados com a cepa parental (FGA/89) e neurovirulenta (FGA/NA a5c).

A falta de lâminas de microarranjo disponíveis para realizar hibridações entre as amostras infectadas com as cepas parental e neurovirulenta, dificultou a identificação de genes diferencialmente expressos nesta situação. Além disso, o modelo utilizado, de análise de tecido ao invés de culturas celulares, apesar de ser mais próximo das condições naturais de infecção, é menos sensível, e conseqüentemente, apenas grandes diferenças na expressão gênica acabam por ser detectadas.

No entanto, além dos 148 genes previamente selecionados (infectados versus *mock*), pudemos detectar mais 15 genes, como diferencialmente expressos durante a infecção com a cepa neurovirulenta em comparação à parental. Destes, 13 passaram pelo critério de seleção (duas vezes de aumento e 30% de FDR), e outros 2 (*Ccl4* e *Cxcl9*), apesar de não terem passado no critério de seleção foram considerados diferencialmente expressos, por terem apresentado uma alta modulação no 8° dpi, na infecção com a cepa FGA/NA a5c (Figura A2.5 e A2.6). Foi possível constatar que dos 148 genes selecionados como modulados na infecção com ambas as cepas, apenas 3 encontravam-se mais expressos durante a infecção com a cepa FGA/89 versus FGA/NA a5c (*Ifit3*, *Ms4a4c* e *D12Ertd647e*). Os demais 145 genes apresentaram uma maior magnitude de modulação na infecção com a cepa neurovirulenta, FGA/NA a5c.

Apesar destas diferenças, chama a atenção a modulação diferencial de quatro genes de quimiocinas apenas na infecção com a cepa FGA/NA a5c (*Ccl4*, *Cxcl9*, *Cxcl11* e *Cxcl13*), além dos 3 genes de quimiocinas, modulados na infecção com ambas as cepas (FGA/89 e FGA/NA a5c), *Ccl5*, *Cxcl10* e *Ccl12*. Estas quimiocinas podem desempenhar um papel importante na patogenia da encefalite pelo vírus da dengue. As quimiocinas são moléculas de pequeno peso molecular com atividade quimioatrativa. Podem ser divididas em quatro grupos, com base na posição do aminoácido cisteína na sua porção amino-terminal: C-X-C são quimioatrativas para linfócitos T ativados; C-C atraem uma grande variedade de células, como monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, basófilos e linfócitos T; o tipo C é quimioatrativa para células NK e T; e a do tipo C-X₃-C, atrai células T, NK e neutrófilos (KARPUS, 2001; HUANG et al., 2000).

Trifilo et al. (2004) demonstraram um efeito protetor da expressão da quimiocina *Cxcl10* no SNC murino infectado com o MHV (coronavírus). Este efeito protetor está relacionado ao recrutamento de células NK, resultando na redução do título viral no SNC dependente de IFN- γ . Adicionalmente, foi demonstrado um efeito protetor desta quimiocina na infecção pelo vírus WNV. Neurônios infectados pelo WNV secretam *Cxcl10*, que recruta células T CD8⁺, via receptor CXCR3 (presente em linfócitos T), reduzindo a carga viral no SNC infectado. Estes resultados demonstram ainda que os neurônios podem participar ativamente na indução da resposta imune inata (KLEIN et

al., 2005). Além disso, Liu et al. (2000) demonstraram que a quimiocina Cxcl10 funciona como uma molécula sentinela no SNC e que a mesma é essencial para o desenvolvimento de uma resposta Th1 contra infecções virais no SNC. A inibição de sua função utilizando anticorpos anti-Cxcl10 causou uma redução maior que 70% na infiltração de células T CD4⁺ e CD8⁺, e dos níveis de IFN- γ . Foi demonstrado recentemente que a quimiocina Cxcl10 é também capaz de inibir a ligação do DENV na membrana da célula-alvo, reduzindo a infectividade. Este efeito parece ser devido à competição pela ligação aos receptores de heparan sulfato, entre o vírus e a quimiocina Cxcl10 (CHEN et al., 2006).

Inversamente, apesar de seus efeitos protetores, a quimiocina Cxcl10 tem sido também implicada na patogenia de doenças neurodegenerativas, como a esclerose múltipla, doença de Alzheimer e demência associada ao HIV. Foi demonstrado que a quimiocina Cxcl10 tem um papel deletério em modelo murino de esclerose múltipla, induzido pelo vírus MHV. O tratamento dos animais doentes com anticorpos anti-Cxcl10 reduziu o infiltrado de linfócitos T CD4⁺ e de macrófagos, a expressão de IFN- γ e da quimiocina Ccl5, inibindo a progressão da desmielinização, aumentando a remielinização e melhorando a função neurológica de forma significativa (LIU, KEIRSTEAD e LANE, 2001). Além disso, a quimiocina Cxcl10 pode induzir apoptose em neurônios fetais humanos, devido ao desequilíbrio na homeostasia do cálcio intracelular (SUI et al., 2006).

Outra quimiocina que participa da patogenia das doenças neurodegenerativas é a Ccl5, também conhecida como RANTES. A administração de anticorpos anti-Ccl5 reduziu o infiltrado de células T, em especial as antígeno-específicas, no SNC murino, em um modelo de esclerose múltipla induzida pela infecção com o MHV. Este fato fez com que os animais apresentassem uma melhora significativa da função neurológica, associada à redução da desmielinização e do acúmulo de macrófagos e células T no SNC (GLASS et al., 2004). No entanto, a quimiocina Ccl5 também desempenha um papel protetor em infecções virais. Foi demonstrado que animais deficientes para o receptor CCR5, ao qual se liga a quimiocina Ccl5, apresentam uma maior susceptibilidade à infecção pelo vírus Herpes Simplex-2 (HSV-2). Esta maior susceptibilidade está relacionada à redução da migração de células NK ao sítio de

infecção, possibilitando uma maior replicação viral no tecido vaginal, acarretando na disseminação do vírus para o SNC murino (THAPA, KUZIEL e CARR, 2007).

Uma outra quimiocina que participa da patogênese de doenças neurodegenerativas é a Cxcl13, envolvida na organização estrutural dos tecidos linfóides secundários. Foi demonstrado que a inibição de sua expressão, utilizando animais *knockout* para Cxcl13, reduz a lesão da substância branca e a doença em modelo de esclerose múltipla. A diminuição desta lesão está também associada a uma redução do infiltrado inflamatório no SNC murino (BAGAEVA et al., 2006).

Deste modo, as quimiocinas C-C ou C-X-C podem ser importantes na compreensão da patogenia neurológica causada pelo DENV-1. A migração de células, como macrófagos/monócitos, linfócitos T (CD4⁺ e/ou CD8⁺), células NK, entre outras, apresentam um papel duplo na patogenia das doenças neurológicas. Se por um lado, são importantes para proteger o tecido nervoso de agentes infecciosos, por outro podem induzir doença, pelo ataque a componentes próprios do hospedeiro. Este último evento é comum após infecções virais, através de um mecanismo de mimetismo antigênico no qual o sistema imune ataca componentes do próprio hospedeiro (FUJINAMI et al., 2006). Desta forma, são necessários estudos funcionais mais aprofundados sobre o papel destas quimiocinas, antes de caracterizá-las como tendo um papel benéfico ou deletério na encefalite causada pelo vírus dengue sorotipo 1.

5.5 Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a neurovirulência causada pelo vírus da dengue-1 é dependente da maior habilidade de replicação das diferentes cepas virais no SNC de camundongos. Esta habilidade parece ser induzida por mutações na proteína de E e na porção helicase da NS3. Adicionalmente, o processo de infecção do SNC murino com vírus dengue levou a uma importante ativação de vias relacionadas à resposta imune, como a via de sinalização do IFN tipo I, processamento e apresentação de antígenos e ativação do complemento. A magnitude

desta modulação correlaciona-se positivamente com a replicação viral no SNC. Uma hipótese que pode explicar a neuropatogênese causada pela infecção de DENV-1 é que as altas taxas de replicação da cepa neurovirulenta induzem uma imunopatologia no SNC murino, provavelmente devido à expressão exacerbada dos genes da via de IFN tipo I, bem como, das quimiocinas da família C-C e C-X-C. Os genes de cada uma destas vias, constituem possíveis alvos para o desenho racional de estratégias antivirais, especialmente através da imunomodulação da resposta imune inata (Figura 5.2).

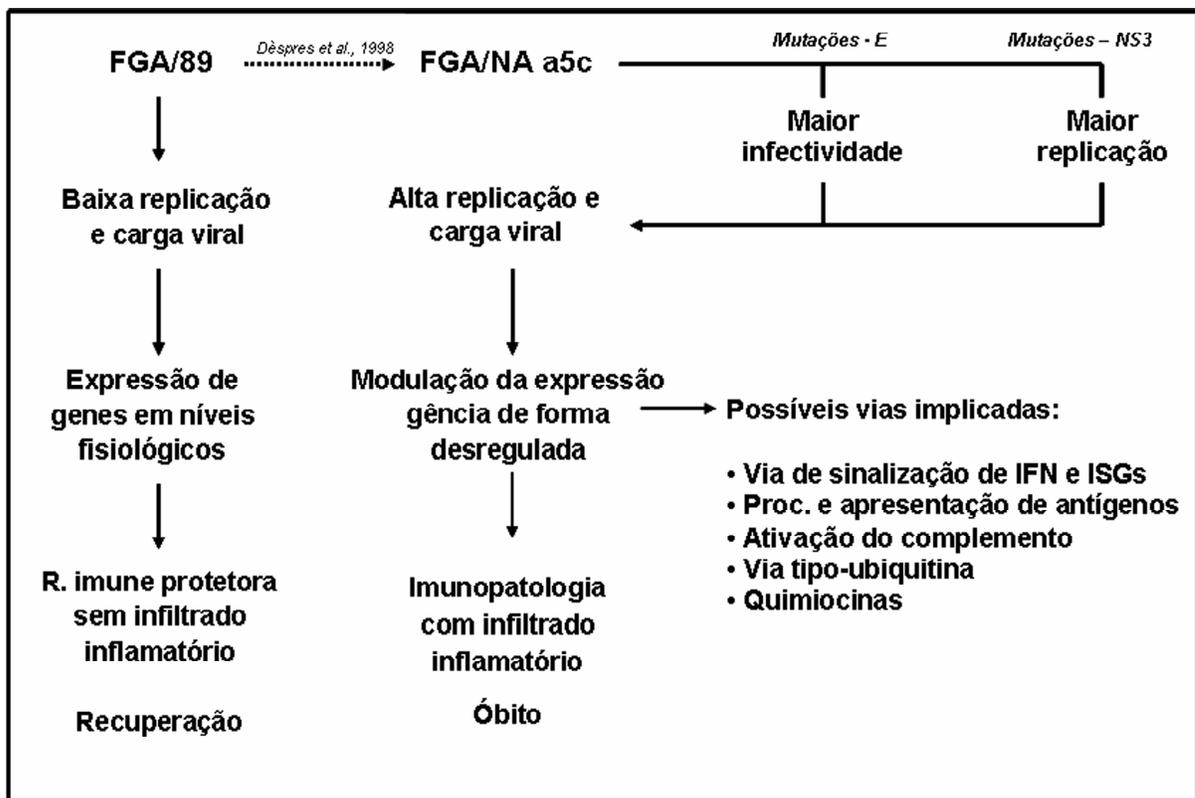


Figura 5.2: Hipótese proposta para explicar a neurovirulência pelo vírus dengue sorotipo 1. A maior capacidade replicativa da cepa neurovirulenta FGA/NA a5c, possivelmente conferida pelas mutações na proteína E e NS3, acabam por desencadear uma expressão desregulada de genes da resposta imune inata. As possíveis vias implicadas na patogenia no SNC murino são: a via de sinalização por IFN, processamento e apresentação de antígenos, ativação do complemento, via tipo-ubiquitina, além das quimiocinas quimioatrativas. Por outro lado, a cepa FGA/89, que replica em níveis menores, pode desencadear uma resposta imune inata protetora. Esta resposta não é basicamente diferente da induzida pela cepa FGA/NA a5c, apenas mais branda, o que explicaria a doença pela cepa FGA/NA a5c como sendo uma imunopatologia.

Uma segunda hipótese para explicar a neurovirulência do DENV-1, seria devido à super-expressão dos genes das quimiocinas C-C e C-X-C no SNC destes animais. A presença destas quimiocinas quimioatrativas poderia explicar o infiltrado inflamatório observado no SNC dos animais infectados com a cepa FGA/NA a5c. De alguma forma, este infiltrado pode desempenhar um papel importante na patogenia da encefalite observada nestes animais. No entanto, estudos mais aprofundados, visando definir quais as principais células presentes neste infiltrado, bem como, quais suas funções no SNC infectado com o vírus da dengue, são necessários.

O presente estudo resultou na descoberta das principais vias de sinalização induzida na infecção pelo DENV-1 no SNC murino. Estas vias podem estar implicadas na proteção dos animais, ou ainda serem as responsáveis pela patogênese da encefalite pelo DENV-1. Duas hipóteses foram sugeridas como responsáveis por explicar a encefalite pelo DENV-1. No entanto, ambas precisam ser testadas em estudos futuros, para se definir precisamente quais os mecanismos responsáveis pela encefalite induzida pela cepa FGA/NA a5c. A definição destes mecanismos, certamente implicará na descoberta de possíveis alvos terapêuticos para o tratamento das complicações neurológicas causadas pelo vírus da dengue, como por exemplo, o bloqueio da atividade de quimiocinas utilizando anticorpos anti-Ccl5 e anti-Cxcl13, os quais, em modelo murino de esclerose múltipla, apresentaram resultados promissores, com melhora sintomática e redução do dano neurológico (GLASS et al., 2004; BAGAEVA et al., 2006).

Os mecanismos imunológicos de controle de infecções e traumas no SNC central são de fundamental importância para a manutenção da vida. No entanto, estes mecanismos precisam ser finamente regulados visando não induzir dano ao tecido. Deste modo, a patogenia induzida pelo vírus dengue no SNC murino deve-se, provavelmente, a uma complexa rede de interações entre fatores virais e do hospedeiro e uma pequena perturbação destas interações pode acarretar o desenvolvimento da doença neurológica pelo vírus dengue.

6. Conclusões

- Foram identificadas três mutações aminoacídicas na cepa FGA/NA a5c, comparado à cepa parental (FGA/89) que podem explicar o fenótipo de neurovirulência: duas na proteína E, Met₁₉₆/Val e Thr₂₇₆/Pro, e uma no domínio helicase da NS3 Leu₃₆₅/Ser.
- Os animais infectados com a cepa neurovirulenta FGA/NA a5c apresentam uma máxima replicação viral e produção de partículas virais infectivas no 9° dpi, um dia antes dos primeiros sinais de encefalite, e evoluem para óbito com $13,1 \pm 2,2$ dpi.
- Os animais infectados com a cepa parental FGA/89 realizam a eliminação completa do vírus até o 30° dpi.
- A cepa BR-01/MR não se mostrou capaz de replicar e de produzir partículas virais infecciosas no SNC, após a infecção com 8.000 ffu_{C636}.
- Os animais inoculados com a cepa parental FGA/89 e BR-01/MR apresentam uma leptomeningite linfocítica crônica sem encefalite, enquanto os animais infectados com a cepa neurovirulenta FGA/NA a5c, apresentam uma leptomeningite linfocítica crônica intensa e uma moderada encefalite.
- As principais células-alvo da infecção no SNC murino são neurônios, especialmente os do córtex intermediário e do hipocampo. Além disso, resultados da imunohistoquímica corroboraram os dados de carga viral e progênie no SNC murino, uma vez que se observou infecção muito mais intensa nos animais inoculados com a cepa neuroadaptada do que com a cepa parental.
- Os experimentos de microarranjo de DNA demonstraram que a infecção do SNC murino com cepas de DENV-1 com diferentes graus de neurovirulência induzem a modulação de 148 genes no SNC murino. Além disso, foi evidenciado que as vias de sinalização de IFN, processamento e apresentação de antígenos via MHC classe I e II e ativação do sistema complemento, são as mais moduladas durante a infecção.

- A magnitude da modulação da expressão de genes nos animais infectados com a cepa neurovirulenta FGA/NA a5c foi maior do que durante a infecção com a cepa FGA/89. Além disso, foram selecionados 15 genes como “diferencialmente” expressos na infecção com a cepa neurovirulenta versus a cepa parental.
- O resultado de quantificação da modulação da expressão gênica, por PCR em tempo real, confirmou os perfis de expressão obtidos por microarranjo, no entanto, claramente observam-se valores discrepantes entre as duas metodologias, provavelmente devido às limitações técnicas dos ensaios.

7. Perspectivas

- Realizar a caracterização funcional do papel da via de sinalização de IFN no curso da infecção com as cepas parental e neuroadaptada em animais *knockouts* para o receptor de IFN tipo I.
- Definir, por experimentos de imunolocalização, quais as células (neurônios e/ou células gliais) que expressam os genes de MHC classe I e II no SNC murino.
- Caracterizar o papel da via de processamento e apresentação de antígeno na proteção contra a infecção, ou na indução de dano ao SNC, mediado por linfócitos T.
- Avaliar, por qPCR, a modulação dos genes superexpressos durante a infecção com a cepa neuropatogênica em comparação com a cepa parental.
- Avaliar o papel do gene *Usp18* na inibição da via de sinalização por IFN, e na infecção com o DENV-1, por RNA de interferência.
- Estudar o papel funcional das quimiocinas na neuropatogênese causada por DENV-1 no SNC murino, utilizando bloqueio com anticorpos, bem como, animais *knockout* para o receptor CCR5.
- Realizar experimentos de genômica funcional em culturas primárias de neurônios murinos, infectados com cepas virais que apresentem diferentes graus de neurovirulência, visando conhecer as respostas dos neurônios à infecção pelo vírus da dengue, nos momentos iniciais da infecção.

8. Referências

ANDERSON, R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 229-274, 2003.

AVIRUTNAN, P.; PUNYDEE, N.; NOISAKRAN, S.; KOMOLTRI, C.; THIEMMECA, S.; AUETHAVORNANAN, K.; JAIRUNGSRI, A.; KANLAYA, R.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; PUTTIKHUNT, C. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for nonstructural viral protein NS1 and complement. **Journal of Infectious Disease**, v. 193, p. 1078-1088, 2006.

BAGAEVA, L.V.; RAO, P.; POWERS, J.M.; SEGAL, B.M. CXC Chemokine Ligand 13 Plays a Role in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 7676-7685, 2006.

BALMASEDA, A.; HAMMOND, S.N.; PEREZ, L.; TELLEZ, Y.; SABORIO, S.I.; MERCADO, J.C.; CUADRA, R.; ROCHA, J.; PEREZ, M.A.; SILVA, S.; ROCHA, C.; HARRIS, E. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 449-456, 2006.

BEARE, R. & BUCLEY, M., 2004. **Spot: cDNA microarray image analysis users guide**. <http://spot.cmis.csiro.au/spot/doc/Spot.pFD>

BEASLEY, D.W.C.; WHITEMAN, M.C.; ZHANG, S.; HUANG, C.Y.H.; HIGGS, S.; KINNEY, R.M.; BARRET, A.D.T. Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neurinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8339-8347, 2005.

BENARROCH, D.; SELISKO, B.; LOCATELLI, G.A.; MAGA, G.; ROMETTE, J.L.; CANARD, B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of dengue virus protein NS3 are Mg²⁺ - dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. **Virology**, v. 328, p. 208-218, 2004.

BENTE, D.A.; RICO-HESSE, R. Models of dengue virus infection. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 1, p. 97-103, 2006.

BHOOPAT, L.; BHAMARAPRAVATI, N.; ATTASIRI, C.; YOKSARN, S.; CHAIWUN, B.; KHUNAMOMPONG, S.; SIRISANTHANA, V. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. **Asian Pac. J. All. Immunol.**, v. 14, p. 107-113, 1996.

BIGGER, C.B.; GUERRA, B.; BRASKY, K.M.; HUBBARD, G.; BEARD, M.R.; LUXON, B.A.; LEMON, S.M.; LANFORD, R.E. Intrahepatic Gene Expression during Chronic Hepatitis C Virus Infection in Chimpanzees. **Journal of Virology**, v. 78, n. 24, p. 13779-13792, 2004.

BOKISCH, V.A.; TOP JR, F.H.; RUSSELL, P.K.; DIXON, F.J.; MULLER-EBERHARD, H.J. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 289, p. 996-1000, 1973.

BORDIGNON, J.; STROTTMAN, D.M.; MOSIMANN, A.L.P.; PROBST, C.M.; STELLA, V.; NORONHA, L.; ZANATA, S.M.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. Dengue Neurovirulence in Mice: Identification of Molecular Signatures in E and NS3 Helicase Domains. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 10, p. 1506-1517, 2007.

BOURNE, N.; SCHOLLE, F.; SILVA, M.C.; ROSSI, S.L.; DEWSBURY, N.; JUDY, B.; DE AGUIAR, J.B.; LEON, M.A.; ESTES, D.M.; FAYZULIN, R.; MASON, P.W. Early Production of Type I Interferon during West Nile Virus Infection: Role for Lymphoid Tissues in IRF3-Independent Interferon Production. **Journal of Virology**, v. 81, n. 17, p. 9100-9108, 2007.

BRAY, M.; MEN, R.; TOKIMATSU, I.; LAI, J.C. Genetic Determinants Responsible for Acquisition of Dengue Type 2 Virus Mouse Neurovirulence. **Journal of Virology**, v. 72, n. 2, p. 1647-1651, 1998.

BRAULT, A.C.; POWERS, A.M.; ORTIZ, D.; ESTRADA-FRANCO, J.G.; NAVARRO-LOPEZ, R.; WEAVER, S.C. Venezuelan equine encephalitis emergence: enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 31, p. 11344-11349, 2004.

BURKE, S.D. & MONATH, T.P. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM & Fields BN. **Fields Virology**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Williams. New York. p. 1043-1126, 2001.

CABEZAS, C.S. Dengue em el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica**, v. 22, n. 3, p. 212-228, 2005.

CALISHER, C.H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J.M.; SHOPE, R.E.; PORTERFIELD, J.S.; WESTAWAY, E.G.; BRANDT, W.E. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 37-43, 1989.

CAM, V.B.; FONSMARK, L.; HUE, B.N.; PHUONG, T.N.; POULSEN, A.; HEEGAARD, D.E. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemaorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 6, p. 848-851, 2001.

CANTELAR DE FRANCISCO, N. Dengue in the Caribbean and the Americas II. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 35, n. 2, p. 136-153, 1983.

CAREY, D.E. Chikungunya and dengue. A case of mistaken identity? **J. Hist. Med. Allied Sci.**, v. 26, p. 243-262, 1971.

CARROLL, M.C. The complement system in regulation of adaptative immunity. **Nature Immunology**, v. 5, p. 981-986, 2004.

CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R. & RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHATURVEDI, U.C.; DHAWAN, R.; KHANNA, M.; MATHUR, A. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 859-866, 1991.

CHATURVEDI, U.C.; ELBISHBISHI, E.A.; AGARWAL, R.; RAGHUPATHY, R.; NAGAR, R.; TANDON, R.; PACSA, A.S.; YOUNIS, O.I.; AZIZIEH, F. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. **Journal of Medical Virology**, v. 59, p. 335-340, 1999.

CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; HILEMAN, R.E.; FROMM, J.R.; ESKO, J.D.; LINHARDT, R.J.; MARKS, R.M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparin sulfate. **Nature Medicine**, v. 3, p. 866-871, 1997.

CHEN, J.P.; LU, H.L.; LAI, S.L.; CAMPANELLA, G.S.; SUNG, J.M.; LU, W.Y.; WU-HSIEH, B.A.; LIN, Y.L.; LANE, T.E.; LUSTER, A.D.; LIAO, F. Dengue Virus Induces Expression of CXC Chemokine Ligand 10/IFN- γ -Inducible Protein 10, Which Competitively Inhibits Viral Binding to cell Surface Heparan Sulfate. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 3185-3192, 2006.

CHERKASOVA, E.; LAASSRI, M.; CHIZHIKOV, V.; KOROTKOVA, E.; DRAGUNSKY, E.; AGOL, I.V.; CHUMAKOV, K. Microarray analysis of evolution of RNA viruses: Evidence of circulation of virulent highly divergent vaccine-derived polioviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 16, p. 9398-9403, 2003.

CHERONI, C.; PEVIANI, M.; CASCIO, P.; DEBIASI, S.; MONTI, C.; BENDOTTI, C. Accumulation of human SOD1 and ubiquitinated deposits in the spinal cord of SOD1G93A mice during motor neuron disease progression correlates with a decrease of proteasome. **Neurobiology Disease**, v. 18, p. 509-522, 2005.

CHOTMONGKOL, V.; SAWANYAWISUTH, K. Case report: Dengue hemorrhagic fever with encephalopathy in an adult. **Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health**, v. 35, p. 160-161, 2004.

CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P.M.; RICO-RESSE, R. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitos. **Journal of Virology**, v. 79, n. 2, p. 853-859, 2005.

CROTTY, S.; CAMERON, C.E.; ANDINO, R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 12, p. 6895-6900, 2001.

CUI, T.; SUGRUE, R.J.; XU, Q.; LEE, A.K.; CHAN, Y.C.; FU, J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. **Virology**, v. 246, n. 2, p. 409-417.

DELANO, W.L.; BROMBERG, S. **The PyMOL user's manual**. DeLano Scientific, San Carlos, CA, 2004.

DESPRÈS, P.; FRENKIEL, M.P. & DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, v. 196, p. 209-219, 1993.

DESPRÈS, P.; FRENKIEL, M.P.; CECCALDI, P.E.; DUARTE DOS SANTOS, C.; DEUBEL, V. Apoptosis in the Mouse Central Nervous System in Response to Infection with Mouse-Neurovirulent Dengue Viruses. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 823-829, 1998.

DIAMOND, M.S.; HARRIS, E. Interferon Inhibits Dengue Virus Infection by Preventing Translation of Viral RNA through a PKR-Independent Mechanism. **Virology**, v. 289, p. 297-311, 2001.

DIAZ-HERNANDEZ, M.; HERNANDEZ, F.; MARTIN-APARICIO, E.; GÓMEZ-RAMOS, P.; MORAN, M.A.; CASIANO, J.G.; FERRER, I.; AVILA, J.; LUCAS, J.J. Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 11653-11661, 2003.

DOMINGUES, R.B.; KUSTER, G.W.; ONUKI-CASTRO, F.L.; SOUZA, V.A.; LEVI, J.E.; PANNUTI, C.S. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **Journal of Neurological Science**, v. 267, n. 1-2, 36-40, 2007.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Review in Microbiology**, v. 51, p. 151-178, 1997.

DUARTE DOS SANTOS, C.N.; FRENKIEL, M.P.; COURAGEOT, M.P.; ROCHA, C.F.; VAZEILLE-FALCOZ, M.C.; WIEN, M.W.; REY, F.A.; DEUBEL, V.; DESPRÈS, P. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virology**, v. 274, n. 2, p. 292-308, 2000.

DUSSART, P.; LABEAU, B.; LAGATHU, G.; LOUIS, P.; NUNES, M.R.T.; RODRIGUES, S.G.; STORCK-HERMANN, C.; CESAIRE, R.; MORVAN, J.; FLAMAND, M.; BARIL, L. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. **Clinical Vaccine and Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1185-1189, 2006.

EDGIL, D.; POLACEK, C.; HARRIS, E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. **Journal of Virology**, v. 80, p. 2976-2986, 2006.

FERNÁNDEZ-MESTRE, M.T.; GENDZEKHADZE, K.; RIVAS-VETENCOURT, P.; LAYRISSE, Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 4, p. 469-472, 2004.

FINK, J.; GU, F.; LING, L.; TOLFVENSTAM, T.; OLFAT, F.; CHIN, K.C.; AW, P.; GEORGE, J.; KUZNETSOV, V.A.; SCREIBER, M.; VASUDEVAN, S.G.; HIBBERD, M.L. Host Gene Expression Profiling of Dengue Virus Infection in Cell Lines and Patients. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v. 1(2), n. 86, p. 1-11, 2007.

FLAMAND, M.; MEGRET, F.; MATHIEU, M.; LEPAULT, J.; REY, F.A.; DEUBEL, V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **Journal of Virology**, v. 73, n. 7, p. 6104-6110, 1999.

FUJINAMI, R.S.; VON HERRATH, M.G.; CHRISTEN, U.; WHITTON, L. Molecular Mimicry, Bystander Activation, or Viral Persistence: Infections and Autoimmune Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 80-94, 2006.

GEHRMANN, J.; MONOCO, S.; KREUTZBERG, G.W. Spinal cord microglial cells and DRG satellite cells rapidly respond to transection of the rat sciatic nerve. **Restor. Neurol. Neurosci.**, v. 2, p. 181-198, 1991.

GEHRMANN, J.; GOLD, R.; LININGTON, C.; LANNES-VIEIRA, J.; WEKERLE, H.; KREUTZBERG, G.W. Microglial involvement in autoimmune inflammation of the central and peripheral nervous system. **Glia**, v. 7, p. 50-59, 1993.

GEHRMANN, J.; MATSUMOTO, Y.; KREUTZBERG, G.W. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 20, p. 269-287, 1995.

GEIMONEN, E.; NEFF, S.; RAYMOND, T.; KOCER, S.S.; GAVRILOVSKAYA, N.I.; MACKOW, R.E. Pathogenic and nonpathogenic hantaviruses differentially regulate endothelial cell responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 21, p. 13837-13842, 2002.

GENDELMAN, H.E. Neural immunity: Friend or Foe? **Journal of Neurovirology**, v. 8, p. 474-479, 2002.

GLASS, W.G.; HICKEY, M.J.; HARDISON, J.L.; LIU, M.T.; MANNING, J.E.; LANE, T.E. Antibody Targeting of the CC Chemokine Ligand 5 Results in Diminished Leukocyte Infiltration into the Central Nervous System and Reduced Neurologic Disease in a Viral Model of Multiple Sclerosis. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 4018-4025, 2004.

GRAEBER, M.B.; STREIT, W.J.; KREUTZBERG, G.W. Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 22, p. 103-106, 1989.

GRAEBER, M.B.; STREIT, W.J.; BUERINGER, D.; SPARKS, D.L.; KREUTZBERG, G.W. Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 51, p. 303-311, 1992.

GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S.M.; FORLENZA, O.V.; CABRAL, A.L.B.; VEIGA, S.S.; JULIANO, M.A.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINETTI, A.; ISQUIERDO, I.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Mol. Brain. Res.**, v. 76, p. 85-92, 2000.

GOGATE, N.; SWOVELAND, P.; YAMABE, T.; VERMA, L.; WOYCIECHOWSKA, J.; TARNOWSKA-DZIDUSKO, E.; DYMECKI, J.; DHIB-JALBUT, S. Major histocompatibility complex class I expression on neurons in subacute sclerosing panencephalitis and experimental subacute measles encephalitis. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 55:435-443, 1996.

GOLLINS, S.W.; PORTERFIELD, J.S. pH-dependent fusion between flavivirus West Nile and liposomal model membranes. **Journal of General Virology**, v. 67, p. 157-166, 1986.

GROETTRUP, M.; KRAFT, R.; KOSTKA, S.; STANDERA, S.; STOHWASSER, R.; KLOETZEL, P.M. A third interferon-gamma induced subunit exchange in the 20S proteasome. **European Journal of Immunology**, v. 26, p. 863-869, 1996.

GUBLER, D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G.P.; BRAVO, J.; SOLER, M.; VAZQUEZ, S.; SANTOS, M.; VILLAESCUSA, R.; BASANTA, P.; INDAN, G.; BALLESTER, J.M. Dengue haemorrhagic fever in Cuba. II. Clinical Investigations. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 2, p. 239-241, 1984.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G.; BRAVO, J.; VALDES, L.; VASQUEZ, S.; HALSTEAD, S.B. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Disease**, v. 6, p. 118-124, 2002a.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Disease**, v. 9, p. 800-809, 2002b.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**, v. 27, p. 1-13, 2003.

HALLER, O.; KOCHS, G. & WEBER, F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 18, n. 5-6, p. 425-433, 2007.

HALSTEAD, S.B.; YAMARAT, C.; SCANLON, J.E. The Thai Hemorrhagic Fever epidemic of 1962 (A preliminary report). **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 46, p. 449-462, 1963.

HALSTEAD, S.B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI, Hypotheses and discussion. **Yale J. Biol. Med.**, v. 42, p. 350-362, 1970.

HALSTEAD, S.B.; O'ROURKE, E.J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 1, p. 201-217, 1977.

HALSTEAD, S. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. **Science**, v. 239, p. 46-481, 1988.

HALSTEAD, S.B.; STREIT, T.G.; LAFONTANT, J.G.; PUTVATANA, R.; RUSSEL, K.; SUN, W.; KANESA-THASAN, N.; HAYES, C.G.; WATTS, D.M. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 180-183, 2001.

- HAMMON, W.N.; RUDNICK, A.; SATHER, G.E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philipine and Thailand. **Science**, v. 131, p. 1102-1103, 1960.
- HASEGAWA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOSAKA, T.; FUJITA, S.; KOBAYASHI, Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. **Journal of Virology**, v. 191, p. 158-165, 1992.
- HE, R.T.; INNIS, B.L.; NISALAK, A.; USAWATTANAKUL, W.; WANG, S.; KALAYANAROOJ, S.; ANDERSON, R. Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. **Journal of Medical Virology**, v. 45, p. 451-461, 1995.
- HELT, A.M.; HARRIS, E. S-phase-dependent enhancement of dengue virus type 2 replication in mosquito cells, but not in human cells. **Journal of Virology**, v. 79, p.13218-13230, 2005.
- HEINZ, F.X.; ALLISON, S.L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 63-97, 2003.
- HENCHAL, E.A.; PUTNAK, R. The dengue Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 67 p. 376-396, 1990.
- HICKEY, W.F.; KIMURA, H. Perivascular microglia are bone marrow derived and present antigen in vivo. **Science**, v. 239, p. 290-292, 1988.
- HICKEY, W.F.; VASS, K.; LASSMANN, H. Bone marrow derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 51, p. 246-256, 1992.
- HOLMES, E.C.; WOROBEY, M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. **Molecular Biology Evolution**, v. 16, n. 3, p. 405-409, 1999.
- HOTTA, S. Experimental studies in dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. **Journal of Infectious Disease**, v. 90, p. 1-9, 1952.

HUANG, D.; HAN, Y.; RANI, M.R.S.; GLABINSKI, A.; TREBST, C.; SORENSEN, T.; TANI, M.; WANG, J.; CHIEN, P.; O'BRYAN, S.; BIELECKI, B.; ZHOU, Z.L.; MAJUNDER, S.; RANSOHOFF, R.M. Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. **Immunological Reviews**, v.177, p. 52-67, 2001

IMBERT, J.L.; GUEVARA, P.; RAMOS-CASTAÑEDA, J.; RAMOS, C.; SOTELO, J. Dengue Virus Infects Mouse Cultured Neurons But Not Astrocytes. **Journal of Medical Virology**, v. 42, p. 228-233, 1994.

INNIS, B.L. Dengue and dengue haemorrhagic fever. In: Porterfield JS, editor. **Exotic Viral Infections**. London: Chapman and Hall, pp. 103-146, 1995.

JELACHICH. M.L.; LIPTON, H.L. Theiler's murine encephalomyelitis virus kills restrictive but not permissive cells by apoptosis. **Journal of Virology**, v. 70, p. 6856-6861, 1996.

JIANG, W.R.; LOWE, A.; HIGGS, S.; REID, H.; GOULD, E.A. Single amino acid codon changes detected in Louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 931-935, 1993.

JOLY, E.; OLDSTONE, M.B. Neuronal cells are deficient in loading peptides onto MHC class I molecules. **Neuron**, v. 8, n. 6, p. 1185-90, 1992.

JOHNSTON, C.; JIANG, W.; CHU, T.; LEVINE, B. Identification of genes involved in host response to neurovirulent alphavirus infection. **Journal of Virology**, v. 75, p. 10431-10445, 2001.

JONGEN, P.J.; DOESBURG, W.H.; IBRAHIM-STAPPERS, J.L.; LEMMENS, W.A.; HOMMES, O.R.; LAMERS, K.J. Cerebrospinal fluid C3 and C4 indexes in immunological disorders of the central nervous system. **Acta Neurol. Scand.**, v. 101, n. 2, p. 116-121, 2000.

JUFFRIE, M.; VAN DER MEER, G.M.; HACK, C.E.; HAASNOOT, K.; SUTARYO; VEERMAN, A.J.; THIJS, L.G. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 702-707, 2000.

JUFFRIE, M.; VAN DER MEER, G.M.; HACK, C.E.; HAASNOOT, K.; SUTARYO; VEERMAN, A.J.; THIJS, L.G. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 1, p. 70-75, 2001.

KABRA, S.K.; JUNEJA, R.; MADHULIKA; JAIN, Y.; SINGHAL, T.; DAR, L.; KOTHARI, S.S.; BROOR, S. Myocardial dysfunction in children with dengue haemorrhagic fever. **Natl. Med. J. India**, v. 11, n. 2, p. 59-61, 1998.

KAJASTE-RUDNITSKI, A.; MASHIMO, T.; FRENKIEL, M.P.; GUÉNET, J.L.; LUCAS, M.; DÉSPRES, P. The 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1b Is a Potent Inhibitor of West Nile Virus Replication Inside Infected Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p.4624-4637, 2006.

KAMER, G.; ARGOS, P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. **Nucleic Acids Research**, v. 12, n. 18, p. 7269-7282, 1984.

KARPUS, W.J. Chemokines and central nervous system disorders. **Journal of Neurovirology**, v. 7, p. 493-500, 2001.

KAWANO, H.; ROSTAPSHOV, V.; ROSEN, L.; LAI, C.J. Genetic Determinants of Dengue Type 4 Virus Neurovirulence for Mice. **Journal of Virology**, v. 67, n. 11, p. 6567-6575, 1993.

KERR, J.F.R.; SEARLE, J.; HALLIDAY, W.J.; ROBERTS, T.; COOKSLEY, W.G.E.; HALLIDAY, J.W.; HOLDER, L.; BURNETT, W. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. **Lancet**, v. 20, p. 827-828, 1979.

KHROMYKH, A.A.; SEDLAK, P.L.; WESTAWAY, E.G. TransComplementation analysis of the flavivirus Kunjin NS5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. **Journal of Virology**, v. 73, p. 9247-9255 1999a.

KHROMYKH, A.A.; GUYATT, K.J.; HALL, R.A.; WESTAWAY, E.G. Efficient trans-complementation of the flavivirus Kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. **Journal of Virology**, v. 73, p. 10272-10280, 1999b.

KIM, K.I.; YAN, M.; MALAKHOVA, O.; LUO, J.K.; SHEN, M.F.; ZOU, W.; de la TORRE, J.C.; ZHANG, D.E. Ube1L and protein ISGylation are not essential for alpha/beta interferon signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 2, p. 472-479, 2006.

KIM, K.I.; GIANNAKOPOULOS, N.V.; VIRGIN, H.W.; ZHANG, D.E. Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 21, p. 9592-9600, 2004.

KING, C.A.; MARSHALL, J.S.; ALSHURAF, H.; ANDERSON, R. Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. **Journal of Virology**, v. 74, n. 15, p. 7146-7150, 2000.

KLEIN, R.S.; LIN, E.; ZHANG, B.; LUSTER, A.D.; TOLLETT, J.; SAMUEL, M.A.; ENGLE, M.; DIAMOND, M.S. Neuronal CXCL10 Directs CD8⁺ T-Cell Recruitment and Control of West Nile Virus Encephalitis. **Journal of Virology**, v. 79, n. 17, p. 11457-11466, 2005.

KNAPP, S.; YEE, D.E.; FRODSHAM, A.J.; HENNIG, B.J.; HELLIER, S.; ZHANG, L.; WRIGHT, M.; CHIARAMONTE, M.; GRAVES, M.; THOMAS, H.C.; HILL, A.V. & THURSZ, M.R. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. **Genes Immunity**, v. 4, p. 411-419, 2003.

KOCHS, G.; HALLER, O. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 2082-86, 1999.

KOONIN, E.V. A common set of conserved motif in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. **Nucleic Acid Research**, v. 21, n. 11, p. 2541-2547, 1993.

KUO, C.H.; TAI, D.I.; CHANG-CHIEN, C.S.; LAN, C.K.; CHIOU, S.S.; LIAW, Y.F. Liver biochemical testes and dengue fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, p. 265-270, 1992.

KOURI, G.; GUZMÁN, M.G.; SOLER, M.; GOYENECHEA, A.; MORIER, L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: rapid diagnosis of the etiologic agent. **Bull. Pan Am. Health Organ.**, v. 17, n. 2, p. 126-132, 1983.

KOURI, G.P.; GUZMÁN, M.G.; BRAVO, J.R.; TRIANA, C. Dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuba epidemic, 1981. **Bull World Health Organization**, v. 67, p. 375-380, 1989.

LEE, E.; WEIR, R.C.; DALGARNO, L. Changes in dengue virus major envelope protein on passaging and their localization o three-dimensional structure of the protein. **Virology**, v. 232, p. 281-290, 1997.

LEITMEYER, K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D.M.; SALAS, R.; VILLALOBOS, I.; DE CHACON RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, p. 4738 – 4747, 1999.

LENSCHOW, D.J.; GIANNAKOPOULOS, N.V.; GUNN, L.J.; JOHNSTON, C.; O'GUIN, A.K.; SCHMIDT, R.E.; LEVINE, B.; VIRGIN IV, H.W. Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. **Journal of Virology**, v. 79, p. 13974-13983, 2005.

LIBRATY, D.H.; YOUNG, P.R.; PICKERING, D.; ENDY, T.P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A.L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **The Journal of Infectious Disease**, v. 186, n. 8, p. 1165-1168, 2002.

LIEW, K.J.L.; CHOW, V.T.K. Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. **Journal of Virological Methods**, v. 13, p. 47-57, 2007.

LINDENBACH BD & RICE MR. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe MD & Howley MP, editors. **Fields Virology**. 4ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 991-1042, 2001.

LIU, M.T.; CHEN, B.P.; OERTEL, P.; BUCHMEIER, M.J.; ARMSTRONG, D.; HAMILTON, T.A.; LANE, T.E. Cutting Edge: The T Cell Chemoattractant IFN-Inducible Protein 10 Is Essential in Host Defense Against Viral-Induced Neurologic Disease. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 2327-2330, 2000.

LIU, M.T.; KEIRSTEAD, H.S.; LANE, T.E. Neutralization of the Chemokine CXCL10 Reduces Inflammatory Cell Invasion and Demyelination and Improves Neurological Function in a Viral Model of Multiple Sclerosis. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 4091-4097, 2001.

LUI, W.J.; WANG, X.J.; CLARCK, D.C.; LOBIGS, M.; HALL, R.A.; KHROMYKH, A.A. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuated virus virulence in mice. **Journal of Virology**, v. 80, p. 2396-2404, 2006.

LÜHN, K.; SIMMONS, C.P.; MORAN, E.; DUNG, N.T.P.; CHAU, T.N.B.; QUYEN, N.T.H.; THAO, L.T.T.; NGOC, T.V.; DUNG, N.M.; WILLS, B.; FARRAR, J.; McMICHAEL, A.J.; DONG, T.; ROWLAND-JONES, S. Increased frequencies of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in acute dengue infection. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 5, p. 979-985.

LOKE, H.; BETHELL, D.B.; PHUONG, C.X.T.; DUNG, M.; SCHNEIDER, J.; WHITE, N.J.; DAY, N.P.; FARRAR, J.; HILL, A.V. Strong HLA class I restricted responses in dengue haemorrhagic fever: a double edged sword? **The Journal of Infectious Disease**, v. 184, p. 1369-1373, 2001.

LOZACH, P.Y.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SANCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J.L.; REY, F.A.; DESPRES, P.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; AMARA, A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 23698-23708, 2005.

MACKENZIE, J.M.; KHROMYKH, A.A.; JONES, M.K.; WESTWAY, E.G. Subcellular location and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2a e NS4a. **Virology**, v. 245, p. 203-215, 1998.

MACKENZIE, J.M.; JONES, M.K.; WESTAWAY, E.G. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. **Journal of Virology**, v. 73, n. 11, p. 9555-9567, 1999.

MALATHI, K.; DONG, B.; GALE, M.JR.; SILVERMAN, R.H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. **Nature**, v. 448, p. 816-820, 2007.

MALAKHOV, M.P.; MALAKHOVA, O.A.; KIM, K.I.; RITCHIE, K.J.; ZHANG, D.E. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, 9976-9981, 2002.

MALAKHOVA, O.A.; KIM, K.I.; LUO, J.K.; ZOU, W.; KUMAR, K.G.; FUCHS, S.Y.; SHUAI, K.; ZHANG, D.E. UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. **EMBO Journal**, v. 25, n. 11, p. 2368-67, 2006.

MALAVIGE, G.N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D.J.; SENEVIRATNE, S.L. Dengue Viral Infections. **Postgrad. Med. J.**, v. 80, n. 948, p. 588-601, 2004.

MANDL, C.W. ; ALLISON, S.L.; HOLZMANN, H. ; MEIXNER, T. ; HEINZ, F.X. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. **Journal of Virology**, v. 74, n. 20, p. 9601-9609, 2000.

MARIANNEAU, P.; MEGRET, F.; OLIVIER, R.; MORENS, D.M.; DEUBEL, V. Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. **Journal of General Virology**, v. 77, n. 10, p. 2547-2554, 1996.

MARIANNEAU, P.; CARDONA, A.; EDELMAN, L.; DEUBEL, V.; DESPRÈS, P. Dengue virus Replication in Human Hepatoma Cells activates NF-kB Which in Turn Induces Apoptotic Cell Death. **Journal of Virology**, v. 71, n. 4, p. 3244-3249, 1997.

MARIANNEAU, P. ; STEFFAN, M.A.; ROYER, C.; DROUET, T.M.; JAECK, D.; KIRN, A.; DEUBEL, V. Infection of Primary Cultures of Human Kupffer Cells by Dengue Virus:

No Viral Progeny Synthesis, but Cytokine Production Is Evident. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 5201-5206, 1999.

MATHEW, A. & ROTHMAN, A.L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunol. Rev.**, v. 225, p. 300-313.

MCMINN, P.C.; WEIR, R.C.; DALGARN, L. A mouse-attenuated protein variant of Murray Valley encephalitis virus with altered fusion activity. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 2085-2088, 1996.

MEDIN, C.L.; FITZGERALD, K.A.; ROTHMAN, A.L. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. **Journal of Virology**, v. 79, p. 11053-11061, 2005.

MEHLHOP, E.; DIAMOND, M.S. Protective immune response against West Nile virus are primed by distinct complement activation pathways. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 5, p. 1371-1381, 2006.

MEHLHOP, E.; ANSARAH-SOBRINHO, C.; JOHNSON, S.; ENGLE, M.; FREMONT, D.H.; PIERSON, T.C.; DIAMOND, M.S. Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner. **Cell Host Microbe**, v. 2, n. 6, p. 417-426, 2007.

MIAGOSTOVICH, M.P.; RAMOS, R.G.; NICOL, A.F.; NOGUEIRA, R.M.R.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; MARCHEVSKY, R.S.; MESQUITA, R.P.; SCHATZMAYR, H.G. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clinical Neuropathology**, v. 16, p. 204-208, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, MS, 2007. **Dengue: balanço parcial indica 536 mil casos em 2007**. <http://portal.saude.gov.br/>

MISHTO, M.; BELLAVISTA, E.; SANTORO, A.; STOLZING, A.; LIGORIO, C.; NACMIAS, B.; SPAZZAFUMO, L.; CHIAPPELLI, M.; LICASTRO, F.; SORBI, S.; PESSON, A.; OHM, T.; GRUNE, T.; FRANCESCHI, C. Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. **Neurobiology Aging**, v. 27, p. 54-66, 2006.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 100, n. 12, p. 6986-6991, 2003.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, p. 313-319, 2004.

MONGKOLSAPAYA, J.; DEJNIRATTISAI, W.; XU, X-N.; VASANAWATHANA, S. ; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; CHAIRUNSRI, A.; SAWASDIVORN, S.; DUANGCHINDA, T.; DONG, T.; ROWLAND-JONES, S.; YENCHITSOMANUS, P-T.; McMICHAEL, A.; MALASIT, P.; SCREATON, G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.

MONUZ-JORDAN, J.L.; SANCHEZ-BURGOS, G.G.; LAURENT-ROLLE, M.; GARCIA-SASTRE, A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 100, p. 14333-14338, 2003.

MUNOZ-JORDAN, J.L.; LAURENT-ROLLE, M.; ASHOUR, J.; MARTINEZ-SOBRIDO, L.; ASHOK, M.; LIPKIN, W.I.; GARCIA-SASTRE, A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **Journal of Virology**, v. 79, p. 8004-8013, 2005.

MORENO-ALTAMIRANO, M.M.B.; ROMANO, M.; LEGORRETA-HERRERA, M.; SÁNCHEZ-GARCIA, F.J.; COLSTON, M.J. Gene Expression in Human Macrophages Infected with Dengue Virus Serotype-2. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 60, p. 631-638, 2004.

MUSTAFA, A.S.; ELBISHBISHI, E.A.; AGARWAL, R.; CHATURVEDI, U.C. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 229-233, 2001.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. A structural perspective of flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 13-22, 2005.

MYERS, R.M.; THIRUVENGADAM, K.V.; KRISHNASWAMY, S.; KALYANASUNDARAM, V.; JESUDASS, E.S. Isolation of dengue virus type 2 from a child with encephalitis: cause or coincidence. **Indian Journal of Medical Research**, v. 57, n. 11, p. 2030-2035, 1969.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; ALTMAYER, R.; AMARA, A.; SCHWARTZ, O.; FIESCHI, F.; VIRELIZIER, J.L.; ARENZANA-SEÍSDADOS, F.; DÈSPRES, P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO Reports**, v. 4, p. 723-728, 2003.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DESPRÈS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate Immune Response to Dengue Virus. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 425-435, 2005.

NGUYEN, T.L.; NGUYEN, T.H.; TIEU, N.T. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. **Res. Virol.**, v. 148, p. 273-277, 1997.

NIMMANNITYA, S.; THISYAKORN, U.; HEMSRICHART, V. Dengue haemorrhagic fever with unusual manifestations. **Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health**, v. 18, p. 398-406, 1987.

NOGUEIRA, R.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FILIPPIS, A.M.; PEREIRA, M.A.; SCHATZMAYAR, H.G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

OKUMURA, A.; LU, G.; PITHA-ROWE, I.; PITHA, M.P. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n.5:1440-1445, 2006.

OLSON, J.K.; GIRVIN, A.N.; MILLER, S.D. Direct Activation of Innate and Antigen-Presenting Functions of Microglia following Infection with Theiler's Virus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 20, p. 9780-9789, 2001.

PALMA-DA CUNHA-MATTA, A.; SOARES-MORENO, S.A.; CARDOSO-DE ALMEIDA, A.; AQUILERA-DE-FREITAS, V.; CAROD-ARTAL, F.J. Neurological complications arising from dengue virus infection. **Rev. Neuro.**, v. 39, p. 233-237, 2004.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, PAHO, 2007. **Dengue Outbreak in Paraguay: Follow-Up**. www.paho.org/English/AD/DPC/CD/eid-eer-2007-03-15.htm

PANG, T.; CARDOSA, M.J.; GUZMAN, M.G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 43-45, 2007.

PATEY, O.; OLLIVAUD, L.; BREUIL, J.; LAFAIX, C. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 6, p. 793-802, 1993.

PARK, W.D.; STEGALL, M.D. A meta-analysis of kidney microarray datasets: investigation of cytokine gene detection and correlation with rt-PCR and detection thresholds. **BMC Genomics**, v.30, n. 8, 88, 2007.

PASIEKA, J.T.; BAAS, T.; CARTER, S.V.; PROLL, C.S.; KATZE, G.M.; LEIB, A.D. Functional Genomics Analysis of Herpes Simplex Virus Type 1 Counteraction of the Host Innate Response. **Journal of Virology**, v. 80, n. 15, p. 7600-7612, 2006.

PERELYGIN, A.A.; SCHERBIK, S.V.; ZHULIN, I.B.; STOCKMAN, B.M.; LI, Y.; BRINTON, M.A. Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, n. 14, p. 9322-9327, 2002.

PHOOLCHAREON, W.; SMITH, D.R. Internalization of dengue virus is cell cycle modulated in HepG2, but not vero cells. *Journal of Medical Virology*, v. 74, p. 434-441, 2004.

POERSCH, O.C.; PAVONI, D.P.; QUEIROZ, M.H.; de BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; DUARTE dos SANTOS, C.N.; KRIEGER, M.A. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 4, p. 272-277, 2005.

POPE, J.G.; VANDERLUGT, S.M.; RAHBE, S.M.; LIPTON, H.L.; MILLER, S.D. Characterization of and Functional Antigen Presentation by central Nervous System Mononuclear Cells from Mice Infected with Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7762-7771, 1998.

PRYOR, M.J.; CARR, J.M.; HOCKING, H.; DAVIDSON, A.D.; LI, P.; WRIGHT, P.J. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 65:427-434, 2001.

RAMOS, C.; SÁNCHEZ, G.; PANDO, H.R.; BAQUERA, J.; HERNÁNDEZ, D.; MOTA, J.; RAMOS, J.; FLORES, A.; LLAUSÁS, E. Dengue virus in the brain of fatal case of hemorrhagic dengue fever. **Journal of Neurovirology**, v. 4, p. 465-468, 1998.

REDWINE, J.M; BUCHMEIER, M.J.; EVANS, C.F. In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection. **American Journal of Pathology**, v. 159, n. 4, p. 1219-1224, 2001.

REMPEL, L.A.; AUSTIN, K.J.; RITCHIE, K.J.; YAN, M.; SHEN, M.; ZHANG, D.E.; HENKES, L.E.; HANSEN, T.R. Ubp43 gene expression is required for normal Isg15 expression and fetal development. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 5, 13, 2007.

REY, F.A.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.; KUNZ, C.; HARRISON, S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2Å resolution. **Nature**, v. 375, p. 291-298, 1995.

REY, F.A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 100, n. 12, p. 6899-6901, 2003.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L.M.; SALAS, R.A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; MESA, M.T.R.; NOGUEIRA, R.M.R.; ROSA, A.T. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, p. 244-51, 1997.

RIGAU-PÉREZ, J.G.; CLARK, G.G.; GLUBER, D.J.; REITER, P.; SANDERS, E.J.; VORDAM, A.V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 352, p.971-977, 1998.

RITCHIE, K.J.; MALAKHOV, M.P.; HETHERINGTON, C.J.; ZHOU, L.; LITTLE, M.T.; MALAKHOVA, O.A.; SIPE, J.C.; ORKIN, S.H.; ZHANG, D.E. Dysregulation of protein modification by ISG15 results in brain cell injury cell injury. **Genes and Development**, v. 16, n. 17, p. 2207-2212, 2002.

RITCHIE, K.J.; CHANG, S.H.; KIM, K.I.; YAN, M.; ROSARIO, D.; LI, L.; DE LA TORRE, J.C.; ZHANG, D.E. Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. **Nature Medicine**, v. 10. n. 12, p. 1374-1378, 2004.

ROSEN, L. The Emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, p. 337-343, 1977.

ROTHMAN, A.L. Viral pathogenesis of dengue infections. In: Gubler DJ, Kuno G. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International. 1997.

ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Virology**, v. 257:1-6, 1999.

RUS, H.; CUDRICI, C.; DAVID, S.; NICULESCU, F. The complement system in central nervous system disease. **Autoimmunity**, v. 39, n. 5, 395-402, 2006.

RUSH, B. An Account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia, in the summer and autumn of the year 1780. In: **Medical Inquires and Observations**, Prichard and Hall, Philadelphia. pp. 89-100, 1789.

SABIN, A.B. Research on dengue during World War II. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, p. 30-50, 1952.

SARKAR, J.K.; MONDAL, A.; CHAKARAVARTY, S.K.; CHATTERJEE, S.N.; PAL, S.R. Isolation of dengue virus from the blood of a clinical case of encephalitis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 57, n. 9, p. 1616-1620, 1969.

SARIOL, C.A.; MUÑOZ-JORDÁN, J.L.; ABEL, K.; ROSADO, L.C.; PANTOJA, P.; GIAVEDONI, L.; RODRIGUEZ, V.; WHITE, L.J.; MARTINEZ, M.; ARANA, T. & KRAISELBURD, E.N. Transcriptional Activation of Interferon-Stimulated Genes but Not of Cytokine Genes after Primary Infection of Rhesus Macaques with Dengue Virus Type 1. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 6, p. 756-766, 2007.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 531-562, 2004.

SAKUNTABHAI, A.; TURBPAIBOON, C.; CASADÉMONT, I.; CHUANSUMRIT, A.; LOWHNOO, T.; KAJASTE-RUDNITSKI, A.; KALAYANAROOJ, S.M.; TANGNARARATCHAKIT, K.; TANGTHAWORNCHAikul, N.; VASANAWATHANA, S.; CHAIYARATANA, W.; YENCHITSOMANUS, P.T.; SURIYAPHOL, P.; AVIRUTNAN, P.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; MATSUDA, F.; YOKSAN, S.; JACOB, Y.; LATHROP, G.M.; MALASIT, P.; DÈSPRES, P.; JULIER, C. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nature Genetics**, v. 37, n. 5, p. 507-513, 2005.

SÁNCHEZ, I.J.; RUIZ, B.H. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. **Journal of General Virology**, n. 77, p. 2541-2545, 1996.

SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R.M.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P. An outbreak of dengue vírus at Rio de Janeiro--1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 245-246, 1986.

SCHATZMAYR, H.G. Dengue Situation in Brazil by year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 179-181, 2000.

SCHERBIK, S.V.; KLUETZMAN, K.; PERELYGIN, A.A.; BRINTON, M.A. Knock-in of the Oas1b^f allele into a flavivirus-induced disease susceptible mouse generates the resistant phenotype. **Virology**, v. 368, p. 232-237, 2007.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 467-470, 1995.

SHAW, M.L.; PALESE, P. Viruses and the Innate Immune System. In: Palese, P., (ed), **Modulation of Host Gene Expression and Innate Immunity by Viruses**. Springer (1ed), Norwell, MA. pp. 1-9, 2005.

SHIN, E.C.; SEIFERT, U.; KATO, T.; RICE, C.M.; FEINSTONE, S.M.; KLOETZEL, P.M.; REHERMANN, B. Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 11, p. 3006-3014, 2006.

SHOPE, R.E. Impacts of global climate change on human health: Spread of infectious disease. In: Majumdar, S.K., Kalkstein, L.S., Yarnal, B., Miller, E.W., Rosenfeld, L.M. (eds). **Global climate change: Implications, challenges and mitigation measures**. Easton, PA: The Pennsylvania Academy of Science. p. 363-370, 1992.

SIERRA, B.; ALEGRE, R.; PÉREZ, A.B.; GARCIA, G.; STURN-RAMIREZ, K.; OBASANJO, O.; AGUIRRE, E.; ALVAREZ, M.; RODRIGUEZ-ROCHE, R.; VALDÉS, L.; KANKI, P.; GUZMÁN, M.G. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. **Human Immunology**, v. 68, n. 6, p. 531-540, 2007.

SILER, J.F.; Hall, M.W.; Hitchens, A.P. Dengue: Its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. **Philippine Journal of Science**, v. 29, p. 1-304, 1926.

SIMMONS, J.S. Dengue Fever. **American Journal of Tropical Medicine**, v.s.1-11, n. 2, p. 77-102, 1931.

SIMMONS, C.P.; POPPER, S.; DOLOCEK, C.; CHAU, T.N.; GRIFFITHS, M.; DUNG, N.T.; LONG, T.H.; HOANG, D.M.; CHAU, N.V.; THAO LE, T.T.; HIEN, T.T.; RELMAN, D.A.; FARRAR, J. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Disease**, v. 195, n. 8, p. 1097-1107, 2007.

SMITH, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. **Statistical applications in Genetics and Molecular Biology**, v. 3, n. 1, 3, 2004.

SOLOMON, T.; DUNG, M.N.; VAUGHN, W.D.; KNEEN, R.; THAO, T.T.L.; RAENGSAKULRACH, B.; LOAN, T.H.; DAY, J.P.N.; FARRAR, J.; MYINT, A.S.K.; WARRELL, J.M.; JAMES, S.W.; NISALAK, A.; WHITE, J.N. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, v. 355, p.1053-1059, 2000.

SOUNDRAVALLY, R.; HOTI, S.L. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. **Human Immunology**, v. 68, n. 12, p. 973-979, 2007.

SOUNDRAVALLY, R.; HOTI, S.L. Significance of Transporter Associated with Antigen Processing 2 (TAP2) Gene Polymorphisms in Susceptibility to Dengue Viral Infection. **Journal of Clinical Immunology**, in press, 2007.

SPETH, C.; SCHABETSBERGER, T.; MAOHSENIPOUR, I.; STÖCK, G.; WÜRZNER, R.; STOIBER, H.; LASS-FLÖRL, C.; DIERICH, M.P. Mechanism of human immunodeficiency virus-induced complement expression in astrocytes and neurons. **Journal of Virology**, v. 76, n. 7, p. 3179-3188, 2002.

STIASNY, K.; KÖSSL, C.; HEINZ, F.X. Differences in the Postfusion Conformations of Full-Length and Truncated Class II Fusion Protein E of Tick-Borne Encephalitis Virus. **Journal of Virology**, v. 70, n. 10, p. 6511-6515, 2005.

STREIT, W.J.; GRAEBER, M.B.; KREUTZBERG, G.W. Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motoneuron injury. **Exp. Neurol.**, v. 105, p. 115-126, 1989.

STROTMANN, D.M. **Neuroadaptação de Vírus Dengue em Modelo Murino: Identificação de Marcadores Moleculares**. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, 2008, p. 110.

SUAYA, J.A.; SHEPARD, D.S.; BEATTY, M.E. Dengue: burden of disease and costs of illness. **Report of the Scientific Working Group meeting on Dengue; 2006 Oct 1–5; Geneva, Switzerland**. Geneva: World Health Organization; 2007. p.35-49.

SUI, Y.; STEHNO-BITTEL, L.; LI, S.; LOGANATHAN, R.; DHILLON, N.K.; PINSON, D.; NATH, A.; KOLSON, D.; NARAYAN, O.; BUCH, S. CXCL10-induced cell death in neurons: role of calcium dysregulation. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 957-964, 2006.

SUMARMO, H.W.; JAHJA, E.; GUBLER, D.J.; SUTOMENGGOLO, T.S.; SAROSO, S.J. Encephalopathy Associated with Dengue Virus. **Lancet**, 449-450, 1978.

SUMARMO, H.W.; JAHJA, E.; GUBLER, D.J.; SUHARYONO, W.; SORENSEN, K. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. **Bull. WHO**, v. 61, p. 693-701, 1983.

SUZUKI, R.; de BORBA, L.; DUARTE DOS SANTOS, C.N.D.; MASON, P.W. Construction of a non-infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type-1: Characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology**, v. 362, n. 2, p. 374-383, 2007.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T.H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRUMPFHERER, C.; FINKE, J.; SUN, W.; ELLER, M.A.; PATTANAPANYASAT, K.; SARASOMBATH, S.; BIRX, D.L.; STEINMAN, R.M.; SCHLESINGER, S.; MAROVICH, M.A. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection in human dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p. 823-829, 2003.

THAPA, M.; KUZIEL, W.A.; CARR, D.J.J. Susceptibility of CCR5-Deficient Mice to Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Is Linked to NK Cell Mobilization. **Journal of Virology**, v. 81, n. 8, p. 3704-3713, 2007.

THOMAS, S.J.; STRICKAMN, D.; VAUGHN, D.W. Dengue Epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. In: Chambers TJ & Monath TP. **Advances in Virus Research, The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development**. California: Elsevier Academic Press, vol. 61, pp. 235-289, 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIACK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acid Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TRIFILO, M.J.; MONTALTO-MORRISON, C.; STILES, L.N.; HURST, K.R.; HARDISON, J.L.; MANNING, J.E.; MASTERS, P.S.; LANE, T.E. CXC Chemokine Ligand 10 Controls Viral Infection in the central Nervous System: Evidence for a Role in Innate Immune Response through Recruitment and Activation of Natural Killer Cells. **Journal of Virology**, v. 78, n.2, p. 585-594, 2004.

TUMPEY, T.M.; SZRETTER, K.J.; VAN HOEVEN, N.; KATZ, J.M.; KOCHS, G.; HALLER, O.; GARCÍA-SASTRE, A.; STAEHELI, P. The Mx1 gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5N1 influenza virus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 19, p. 10818-10821, 2007.

TUSHER, V.G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 98(9):5116-5121, 2001.

UBOL, S.; KASISITH, J.; MITMOONPITAK, C.; PITIDHAMABHORN, D. Screening of upregulated genes in suckling mouse central nervous system during the disease stage of rabies virus infection. **Microbiology and Immunology**, v. 50, n. 12, p. 951-959, 2006.

VALLE, J.R.D.; CHAVEZ-SALINAS, S.; MEDINA, F.; DEL ANGEL, R.M. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. **Journal of Virology**, v. 79, p. 4557-4567, 2005.

VAN de EYNDE, B.J.; MOREL, S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 147-153, 2001.

VASS, K.; LASSMANN, H. Intrathecal application of interferon-gamma: progressive appearance of MHC antigens within the nervous system. **American Journal of Pathology**, v. 137, p. 789-800, 1990.

VAUGHN, D.W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B.L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T.P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A.; NISALAK, A. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. **The Journal of Infectious Disease**, v. 181, p. 2-9, 2000.

VENTER, M.; MYERS, G.T.; WILSON, A.M.; KINDT, J.T.; PAWESKA, T.J.; BURT, J.F.; LEMAN, A.P.; SWANEPOEL, R. Gene expression in mice infected with West Nile virus strains of different neurovirulence. **Virology**, v. 324, p. 119-140, 2005.

VIGNUZZI, M.; STONE, J.K.; ARNOLD, J.J.; CAMERON, C.E.; ANDINO, R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. **Nature**, v. 439, n. 7074, p. 344-348, 2006.

WALI, J.P.; BISWAS, A.; CHANDRA, S.; MALHOTRA, A.; AGGARWAL, P.; HANDA, R.; WIG, N.; BAHL, V.K. Cardiac involvement in Dengue Haemorrhagic Fever. **Int. J. Cardiol.**, v. 64, n. 1, p. 31-36, 1998.

WANG, Y.; BARBACIORU, C.; HYLAND, F.; XIAO, W.; HUNKAPILLER, K.L.; BLAKE, J.; CHAN, F.; GONZALEZ, C.; ZHANG, L.; SAMAHA, R.R. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. **BMC Genomics**, v. 7, 59, 2006.

WARKE, R.V.; XHAJA, K.; MARTIN, K.J.; FOURNIER, M.F.; SHAN, S.K.; BRIZUELA, N.; de BOSCH, N.; LAPOINTE, D.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A.L.; Bosch, I. Dengue Virus Induces Novel Changes in Gene Expression of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Journal of Virology**, v. 77, n. 21, p. 11822-11832, 2003.

WARKE, R.V.; MARTIN, K.J.; GIAYA, K.; SHAW, S.K.; ROTHMAN, A.L.; BOSCH, I. TRAIL Is a Novel Antiviral Protein against Dengue Virus. **Journal of Virology**, 82(1):555-564, 2008.

WATTS, D.M.; PORTER, K.R.; PUTVATNA, P.; VASQUEZ, B.; CALAMPA, C. HAYES, C.G.; HALSTEAD, S.B. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 354, n. 9188, p. 1431-1434, 1999.

WELSH, R.M.; ROTHMAN, A.L. Dengue immune response: low affinity, high febrility. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 820-822, 2003.

WENGLER, G.; WENGLER, G. The carboxy-terminal part of the NS3 protein of West Nile flavivirus can be isolated as soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. **Virology**, v. 184, n. 2, p. 707-715, 1991.

WINKLER, G.; MAXWELL, S.E.; RUEMMLER, C.; STOLLAR, V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. **Virology**, v. 171, n. 1, 302-305, 1989.

WINKLER, G.; RANDOLPH, V.B.; CLEAVES, G.R.; RYAN, T.E.; STOLLAR, V. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. **Virology**, v. 162, n. 1, p. 187-196, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002. **WHO fact sheet 117**. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

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.; FRANKEL, S.S. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v. 68, p. 816-820, 2000.

XU, T.; SAMPATH, A.; CHAO, A.; WEN, D.; NANAQ, M.; CHENE, P.; SUBHASH, G.; LESCAR, J. Structure of the Dengue Virus Helicase/Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2.4Å. **Journal of Virology**, v. 79, n. 16, p. 10278-10288, 2005.

YANG, J.; TUGAL, D.; REISS, C.S. The role of the proteasome-ubiquitin pathway in regulation of the IFN- γ mediated anti-VSV response in neurons. **Journal of Neuroimmunology**, v. 181, p. 34-45, 2006.

YAMAMOTO, Y.; TAKASAKI, T.; YAMADA, K.; KIMURA, M.; WASHIZAKI, K.; YOSHIKAWA, K.; HITANI, A.; NAKAMURA, T.; IWAMOTO, A. 2002. Acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever. **J. Infect. Chemother.**, v. 8, n. 2, p. 175-177, 2002.

YUAN, W.; KRUG, R.M. Influenza B virus NS1 protein NS1 inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. **EMBO Journal**, v. 20, p. 362-371, 2001.

ZHANG, Y.; CORVER, J.; CHIPMAN, P.R.; ZHANG, W.; PLETNEV, S.V.; SEDLAK, D.; BAKER, T.S.; STRAUSS, J.H.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. Structures of immature flavivirus particles. **EMBO Journal**, v. 22, p. 2604-2613, 2003.

Anexo 1

Soluções e tampões

- **TBS-Tris:** 1M Tris HCl (pH 8.0), 5M NaCl
- **TBE:** 89 mM Tris-base, 89 mM Ácido bórico, 2 mM EDTA (pH8.0)
- **PBS:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄
- **PBS/glicerol:** diluir o glicerol a 10% em PBS1x.
- **Acetato de amônio:** solução de acetato de amônio na concentração de 750 mM
- **Tampão de amostra para DNA 10x:** 25% Ficoll (tipo 400), 0,25% azul de bromofenol, 25% xileno cianol FF.
- **Tampão da Fosfatase Alcalina (AP-Buffer):** 100 mM Tris-HCl pH 9,5 1M, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂
- **Tampão STE:** 10mM Tris HCl (pH7.5), 10mM NaCl 5M, 1mM EDTA 0,5M (pH8.0)
- **Tampão TNE:** 50mM tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1mM EDTA.
- **Solução Carboxi Metil Celulose (CMC):** 32% de CMC em água MQ, homogenizar até a dissolver.
- **Solução Triton:** 0,5% de triton X100 em PBS.
- **Solução de sacarose 30%:** 30% de sacarose em tampão TNE. Preparar livre RNase.
- **Solução de sacarose 60%:** 60% de sacarose em tampão TNE. Preparar livre de RNase.
- **Solução de Lise I:** 7M de uréia (PM: 60,06), 2M de tiouréia (PM: 76,12), 4% de Chaps, 40mM sw Tris Base e H₂O ultra pura q.s.p. para 40 mL.
- **Solução de Hibridação:** 5x SSC, Denhardt's 4,2x, ssDNA 0,21 mg/mL, SDS 0,42% e formamida 42%.
- **Solução de Borato de Sódio:** solução de borato de sódio 1M pH 8.0.
- **Solução de Shampoo:** 20 X SSC filtrado (conc. final 2x - 60 ml), 10% SDS (conc. final 0,5% - 8ml), e água q.s.p. para 400 ml.
- **Solução de anidrido succínico:** 335 mL de 1-metil-2-pirrolidinona, 5,5g de anidrido succínico e 15 mL de solução de borato de sódio 1M pH 8.0 (conc. final ~0,043M).
- **Paraformaldeído 3%:** solução de paraformaldeído 3% em PBS 1x. Pesar com mascaró e dissolver na capela.

- **Triton 0,5%:** diluir a solução de Triton X100 em PBS 1x na concentração de 0,5%.
- **Triptose:** dissolver 13 g de Triptose em 100 ml de água ultrapura, e dissolver sob agitação constante e aquecimento. Filtrar a solução em 0.22 μm de forma etérl.
- **SDS 10%:** para 1 litro, dissolver 100 g de SDS em água ultrapura e filtrar em 0,45 μm .
- **SSC 20x:** para 1 litro, dissolver 175 g de NaCl (P.M. 58.4 – conc. final 3M) e 88 g de citrato trisódico 2-hidrato,(Na₃-citrato; P.M. 294.1 – conc. final 0.3M). Filtrar em 0,45 μm .

Anexo 2

Figuras suplementares

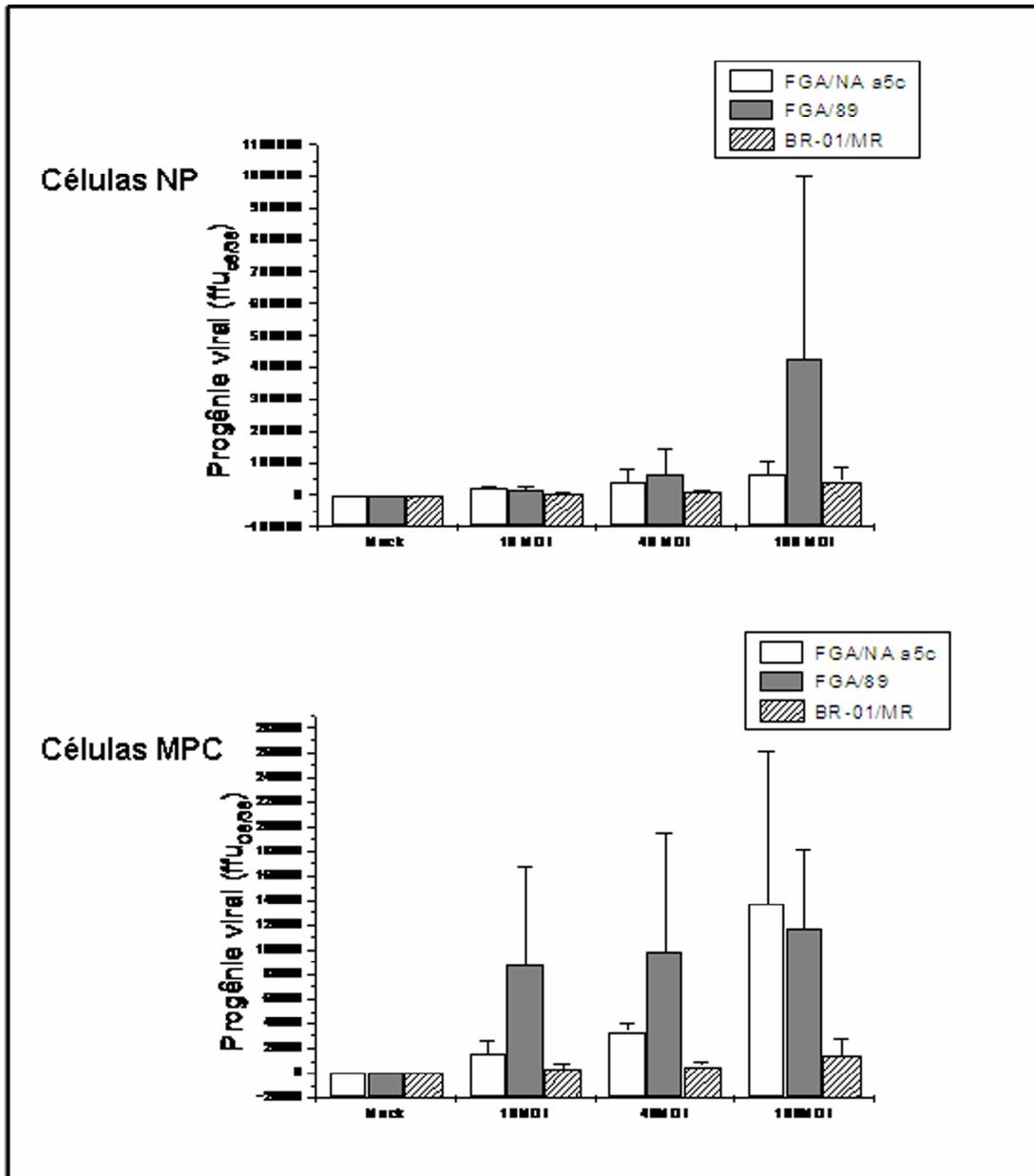


Figura A2.1: Progênie viral no sobrenadante de culturas de células NP e MPC infectadas com as diferentes cepas virais. Culturas de células NP e MPC foram infectadas com diferentes multiplicidades de infecção (MOI, 10, 40 e 100) das cepas virais, FGA/89, FGA/NA a5c e BR-01/MR. Após 24h de infecção a produção de partículas virais infectivas foi testada por titulação em células C636, conforme descrito em Materiais e Métodos. A infecção das células NP e MPC com as diferentes cepas virais não apresentou diferença estatística na produção de partículas virais viáveis, utilizando-se o teste de Fisher, e considerando um valor de $p < 0.05$, como estatisticamente significativo. As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes para as células MPC e dois experimentos para as células NP.

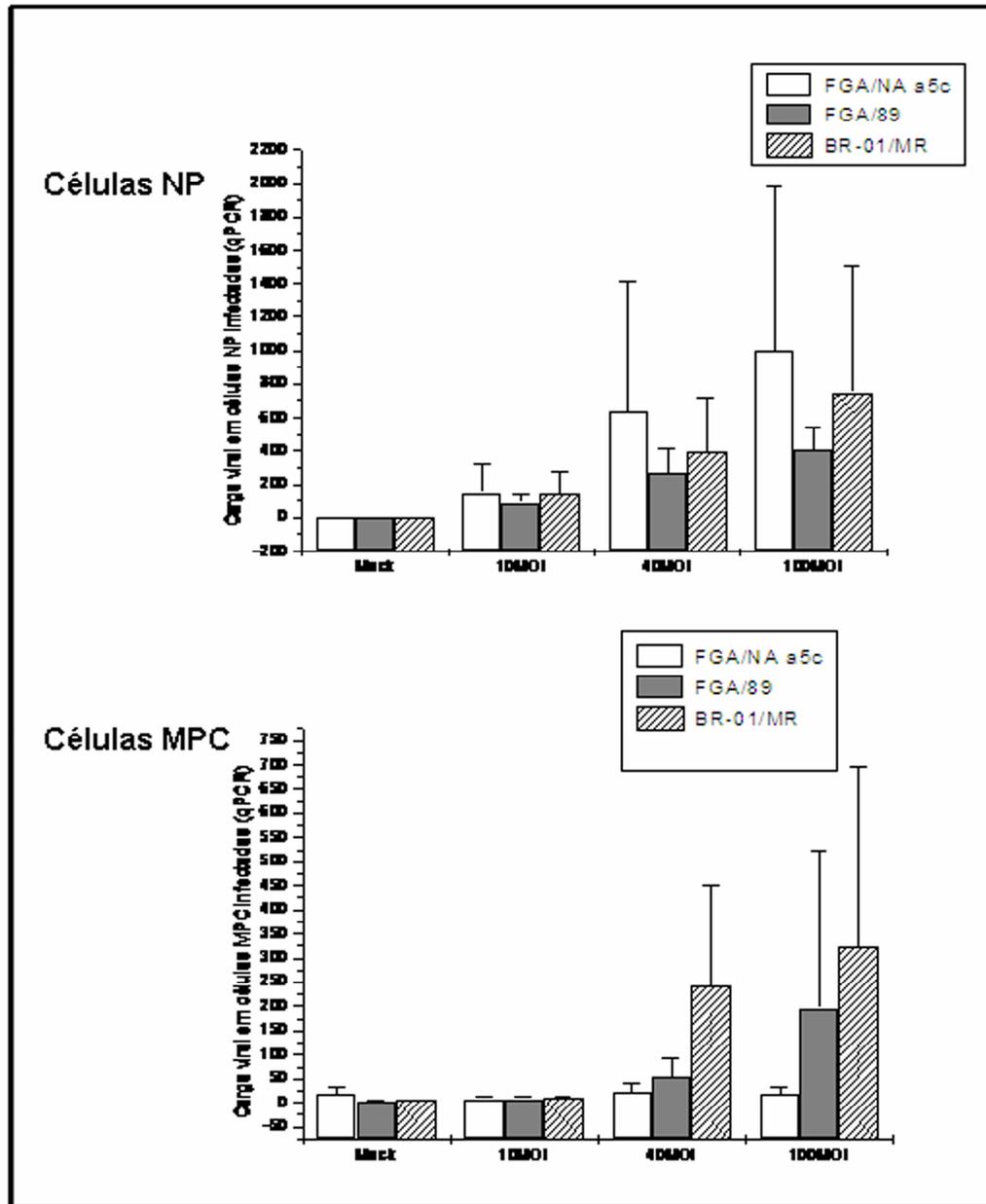


Figura A2.2: Quantificação do RNA viral em células NP e MPC infectadas com as diferentes cepas virais por qPCR. Reação de qRT-PCR para quantificação do RNA viral em células NP e MPC infectadas com diferentes MOI (10, 40, 100), 24 h pós-infecção. As células foram lisadas e o RNA extraído utilizando-se o kit QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante. O RNA viral foi quantificado segundo descrito em Bordignon et al., (2007). A infecção das células NP e MPC com as diferentes cepas virais não apresentou diferença estatística no RNA viral utilizando-se o teste de Fisher, considerando um valor de $p < 0.05$, como estatisticamente significativo. As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes.

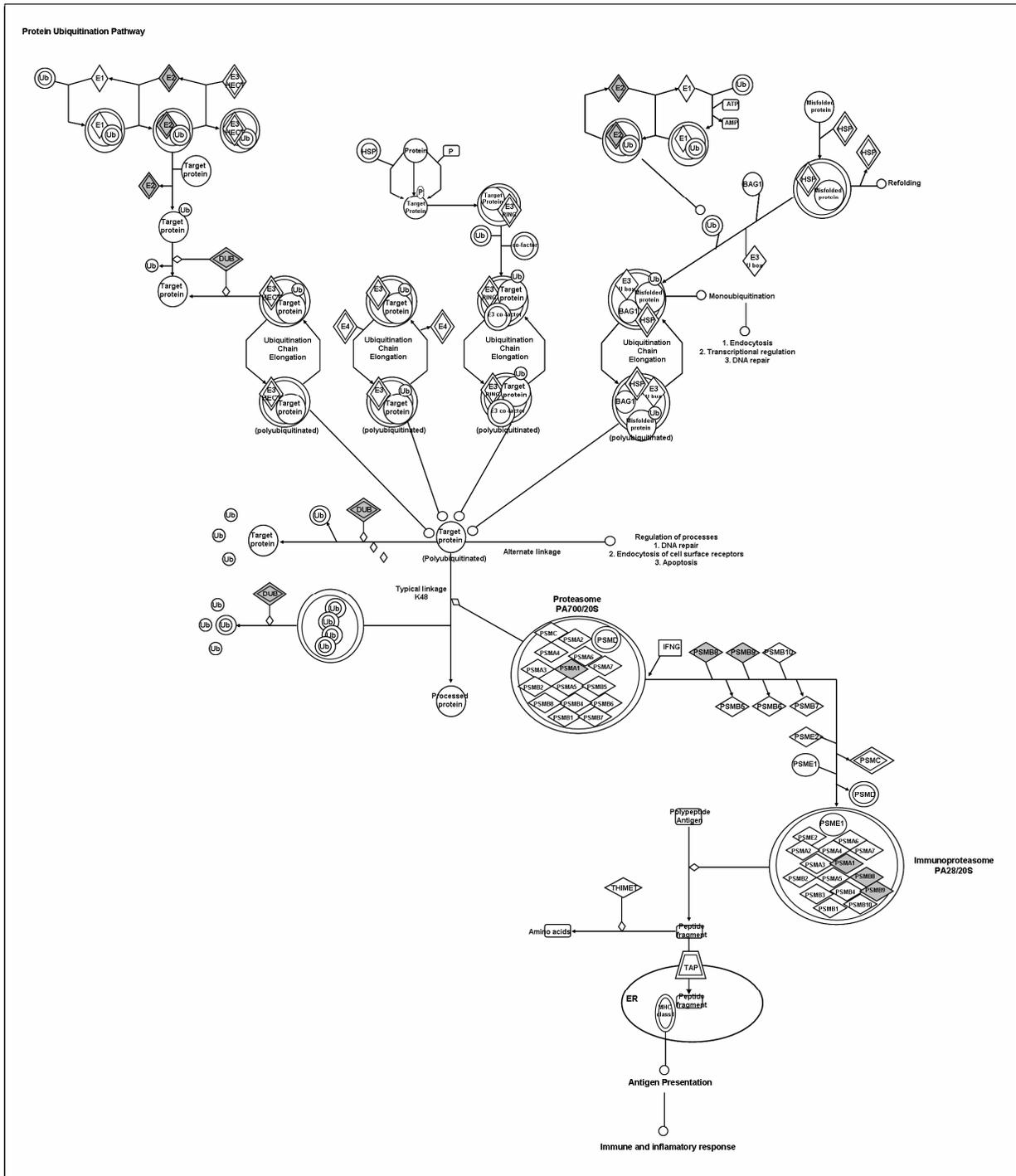


Figura A2.3: Representação dos genes modulados na via tipo-ubiquitina. A lista contendo os 149 genes modulados durante a infecção pelo vírus dengue sorotipo-1 (FGA/89 e FGA/NA a5c) foi analisada com a utilização do software *Ingenuity® Systems*. A via apresentou valor de $p = 7,96 \times 10^{-6}$, e apresentou 9 genes modulados em 203. Em cinza estão representados os genes desta via, modulados durante a infecção por DENV-1 no SNC murino.

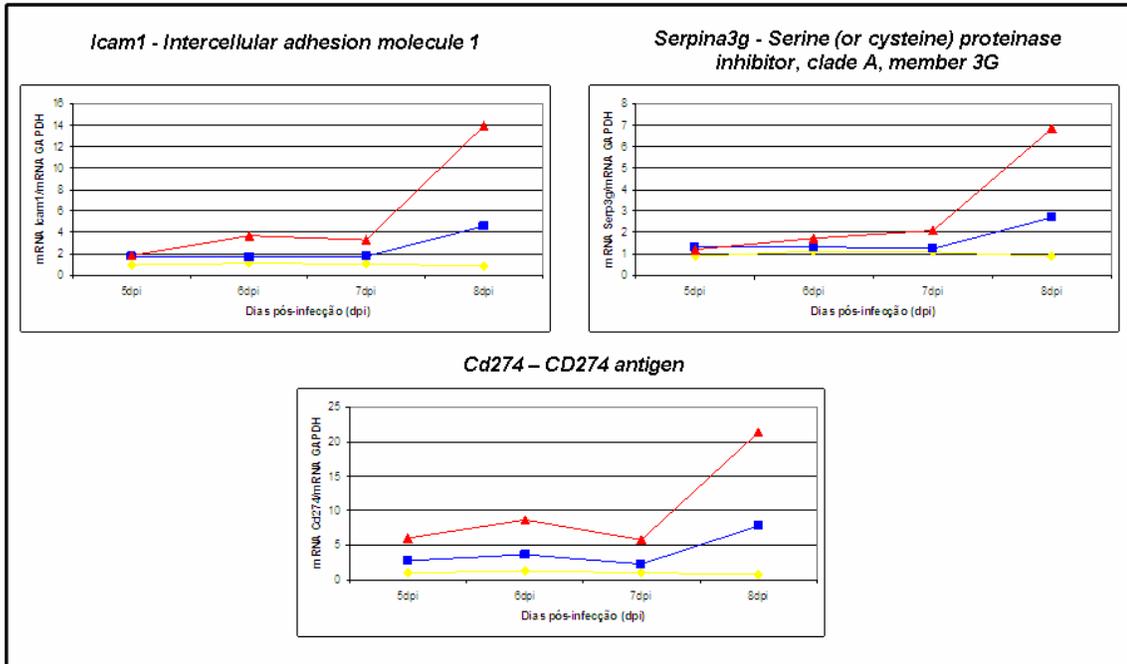
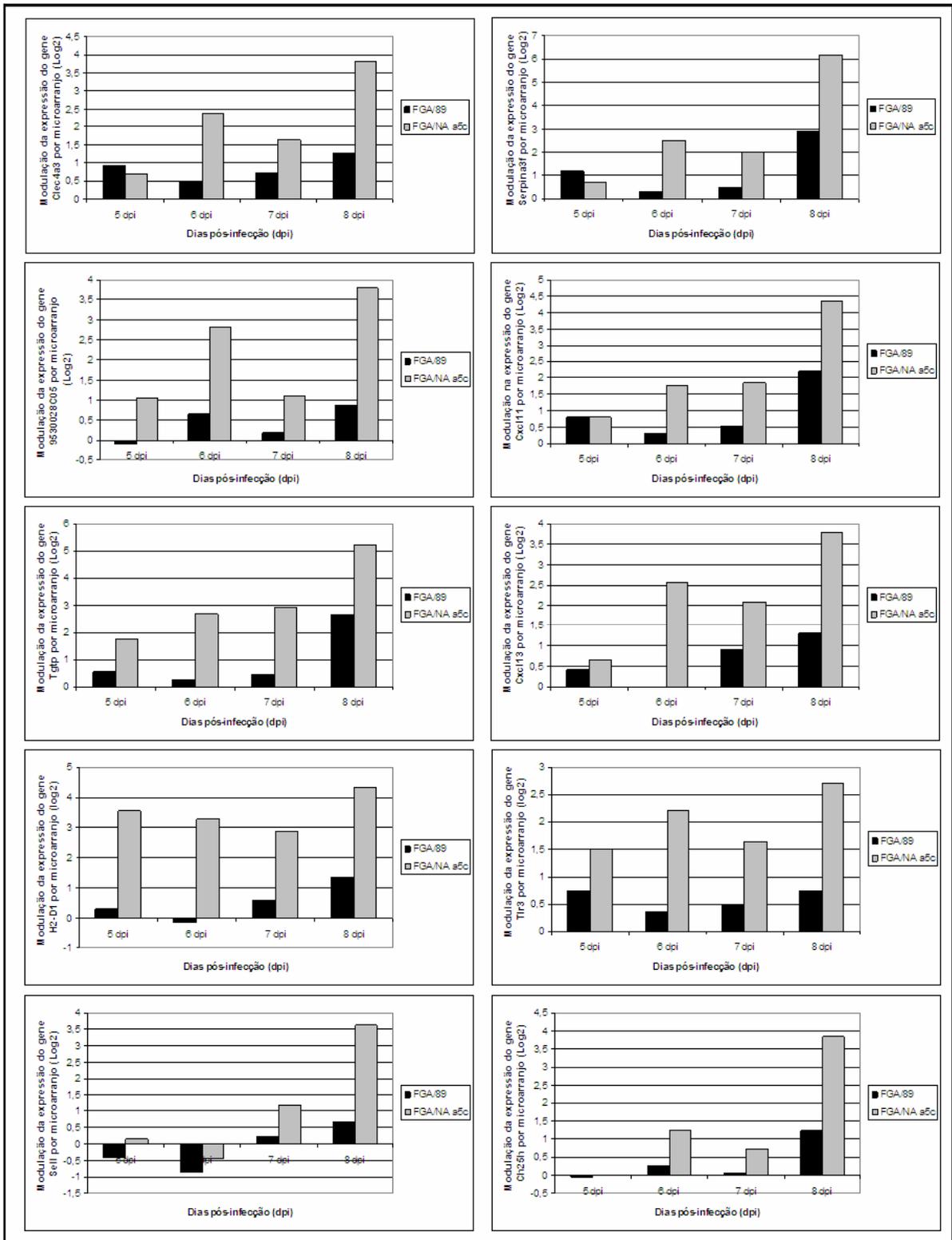


Figura A2.4: Quantificação da modulação dos genes *Icam1*, *Cd274* e *Serpina3g* no SNC de camundongos suíços infectados com as cepas: FGA/89 (azul), FGA/NA a5c (vermelho) e mock (amarelo) nos dias 5, 6, 7 e 8 dpi. O gene *Icam1* que apresenta função de receptor de transmembrana e de ligação à proteínas, está envolvido na adesão célula-célula e na regulação da adesão celular. O gene *Serpina3g* tem função de inibidor de endopeptidase, participando da resposta imune e da indução de apoptose. O gene *Cd274* apresenta atividade de receptor, e esta envolvida na resposta imune e na proliferação celular. Os valores de modulação da expressão dos genes são definidos pela razão entre o valor do gene X em determinado tempo (5, 6, 7 e 8 dpi), dividido pelo valor do controle mock (controle negativo), no mesmo tempo. Normalização com o gene murino *Gapdh*. Anotação funcional realizada com o auxílio do software *Ingenuity® Systems*.



Continua na próxima página

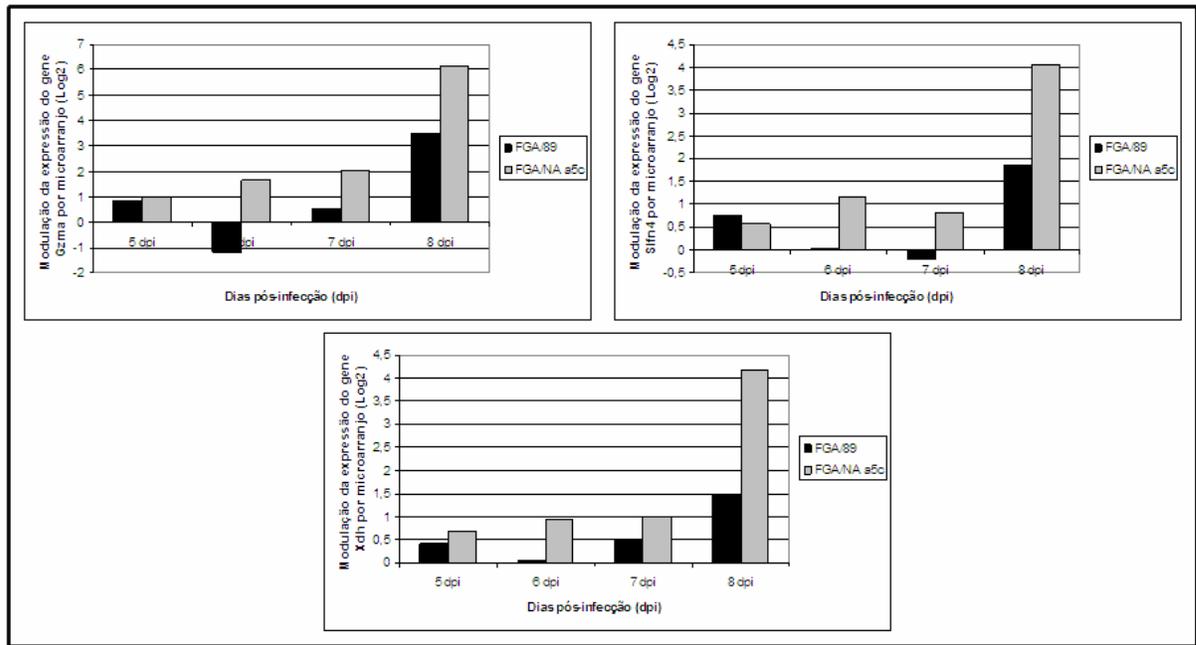


Figura A2.5: Modulação da expressão dos genes *Clec4a3*, *Serpin3f*, *9530028C05*, *Cxcl11*, *Tgtp*, *Cxcl13*, *Tlr3*, *H2-D1*, *Gzma*, *Xdh*, *Ch25h*, *Sell* e *Sfn4* por microarranjo (valores em Log2). Os valores são expressos como modulação do gene nos animais infectados diminuindo-se a expressão dos genes nos animais não infectados. Os treze genes supracitados são os que superaram o critério de seleção (2 x vezes mais modulado).

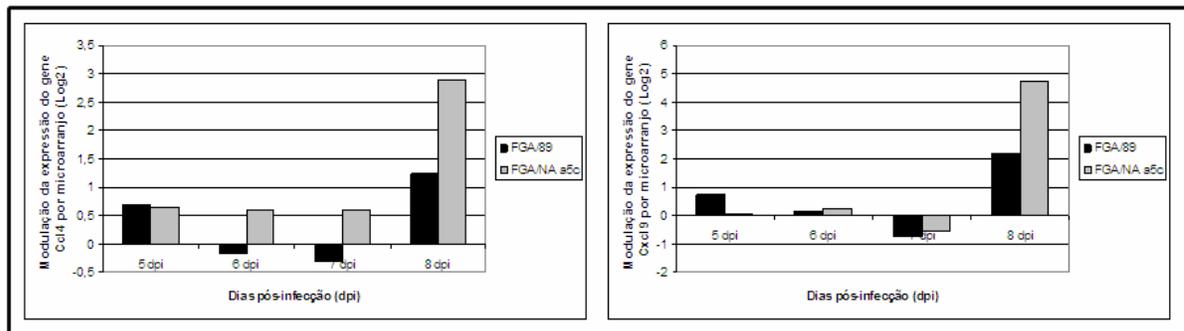
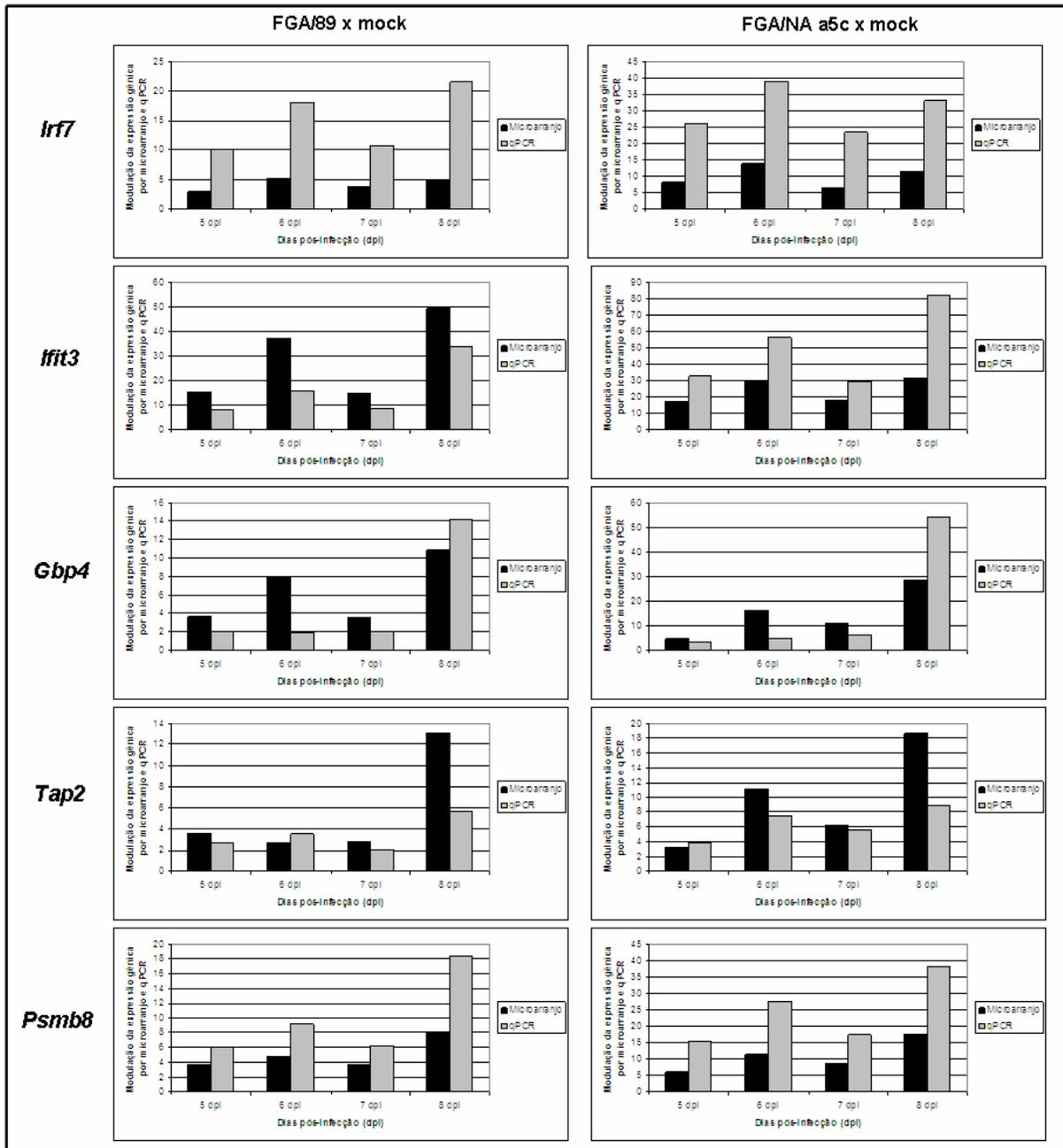
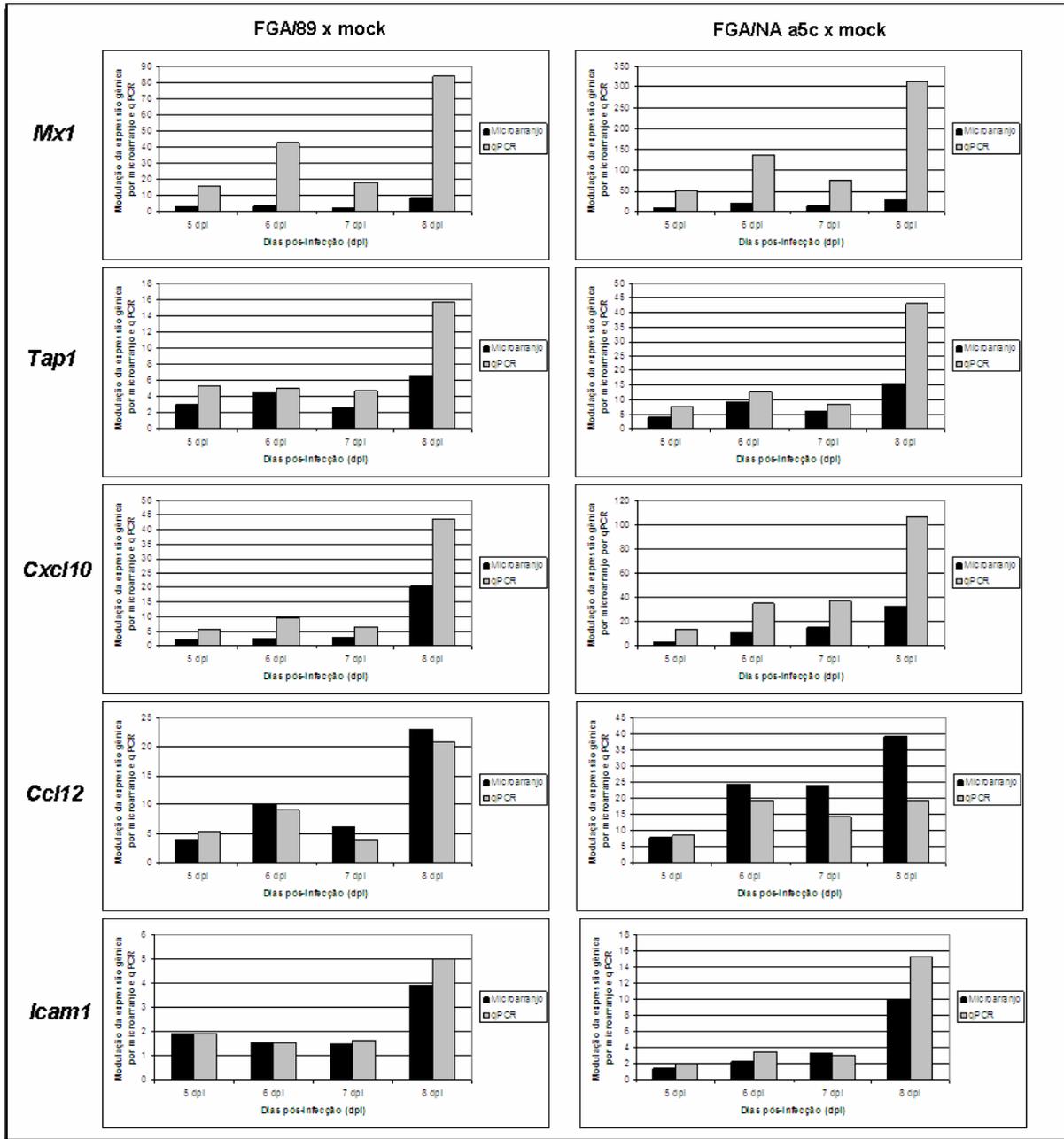


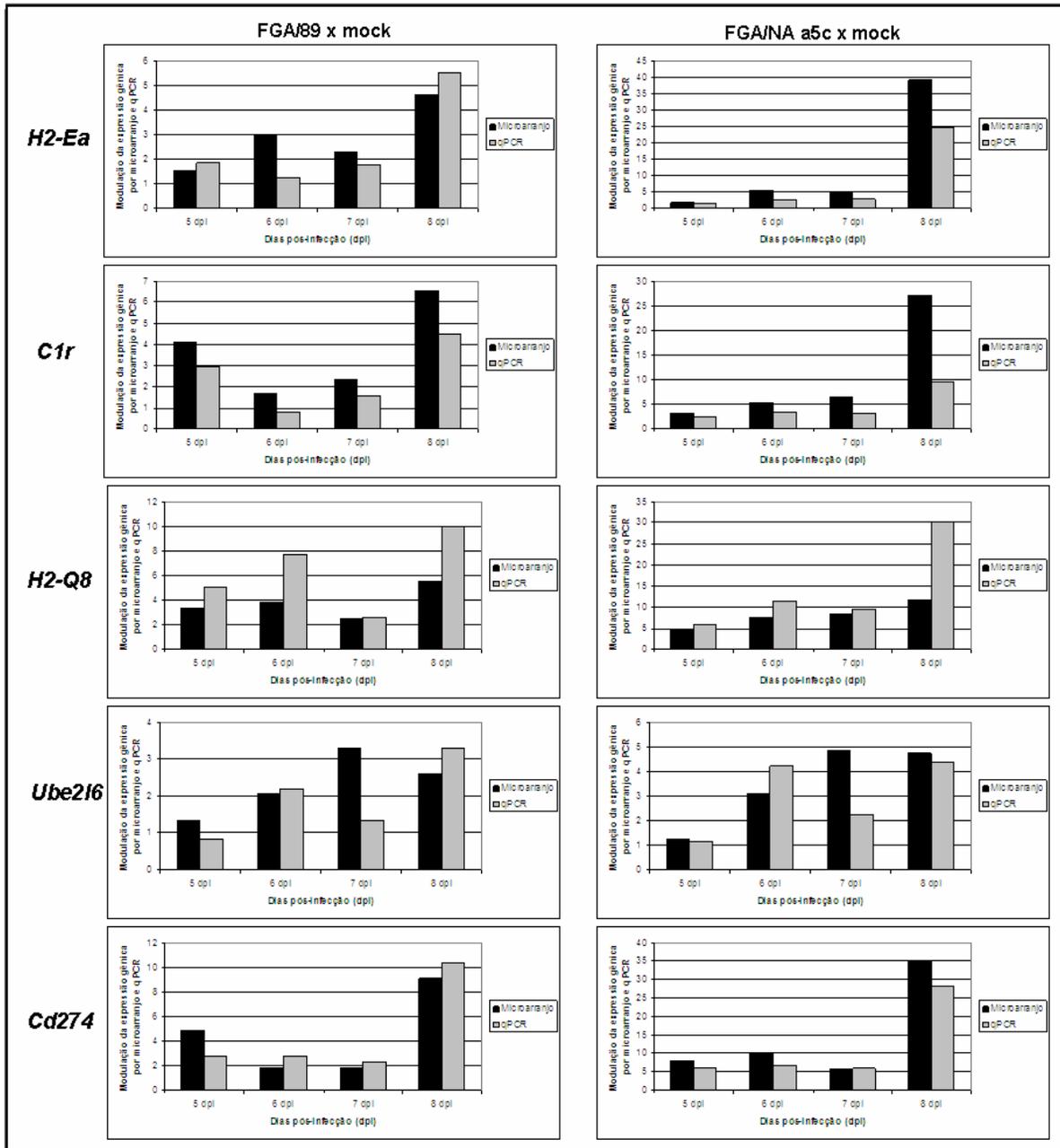
Figura A2.6: Modulação da expressão dos genes *Ccl4* e *Cxcl9* por microarranjo (valores em Log2). Os genes acima não superaram o critério de seleção de duas vezes mais modulados na infecção em relação ao seu controle negativo. No entanto, pode-se observar um importante aumento na infecção com a cepa neurovirulenta FGA/NA a5c no 8 dpi, próximo ao aparecimento de sinais de doença. Deste modo, mesmo estes genes não tendo superado os critérios de seleção, eles foram considerados modulados na infecção com a cepa FGA/NA a5c. Os valores são expressos como modulação do gene nos animais infectados diminuindo-se a expressão dos genes nos animais não infectados.



Continua na próxima página



Continua na próxima página



Continua na próxima página

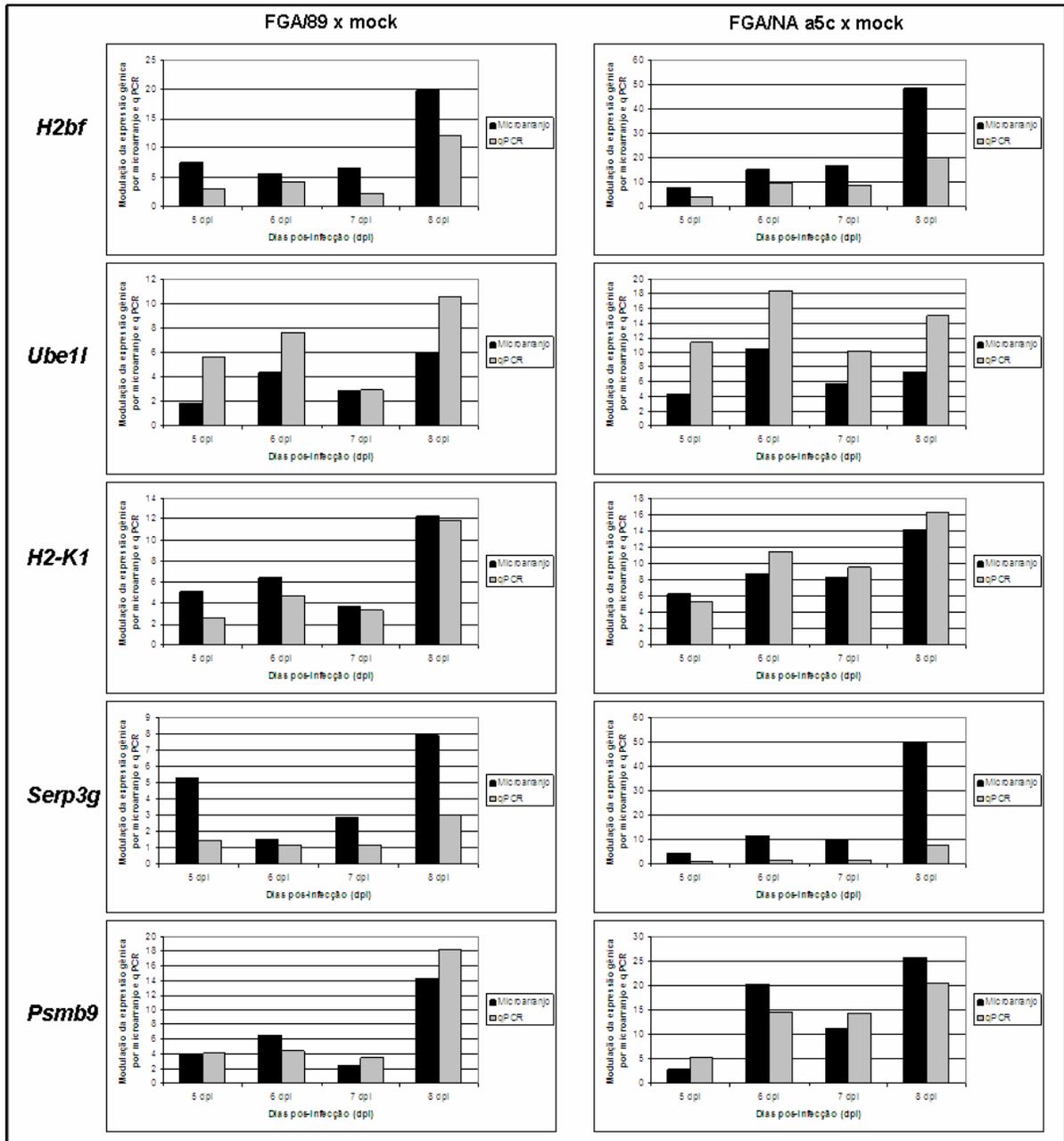


Figura A2.7: Comparação da modulação da expressão gênica obtida pelas técnicas de microarranjo (preto) e qPCR (cinza). A modulação da expressão dos genes *Irf7*, *Ifit3*, *Gbp4*, *Tap2*, *Psm8*, *Mx1*, *Tap1*, *Cxcl10*, *Ccl12*, *Icam1*, *H2-Ea*, *C1r*, *H2-Q8*, *Ube2l6*, *Cd274*, *H2bf*, *Ube11*, *H2-K1*, *Serpina3g*, *Psm9*, no SNC murino infectado com as cepas FGA/89 e FGA/NA a5c (comparada aos animais infectados com mock) foi quantificada por microarranjo e qPCR.

Anexo 3

Artigos publicados entre 2004 e 2008:

- BORDIGNON, J.; GRISARD, E.C. & ZANETTI, C.R., 2005. Molecular Detection and Characterization of Rabies Virus in Brazil: new approaches for epidemiology and surveillance. **Virus Reviews and Research**, 1(10):14-22.
- RABONI, S.M.; PROBST, C.M.; BORDIGNON, J.; ZEFERINO, A.; DUARTE DOS SANTOS, C.N., 2005. Hantavirus in Central South America: Phylogenetic Analyses of S Segment from HPS Cases in Paraná, Brazil. **Journal of Medical Virology**,
- DEBUR, M.C.; BORDIGNON, J.; DUARTE DOS SANTOS, C.N., VIDAL, L.R.; NOGUEIRA, M.B.; ALMEIDA, S.M.; RABONI, S.M., 2007. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. **Journal of Clinical Virology**, 39:59-62.
- BORDIGNON, J.; STROTTMANN, MOSIMANN, A.L.P.; PROBST, C.M.; STELLA, V.; NORONHA, L.; ZANATA, S.M.; DUARTE DOS SANTOS, C.N., 2007. Dengue Neurovirulence in Mice: Identification of Molecular Signatures in the E and NS3 Helicase Domains. **Journal of Medical Virology**, 79:1506-1517.
- BORDIGNON, J.; PROBST, C.M.; MOSIMANN, A.L.P.; PAVONI, D.P.; STELLA, V.; BUCK, G.A.; SATPROEDPRAI, N.; FAWCETT, P.; ZANATA, S.M.; NORONHA, L.; KRIEGER, M.A.; DUARTE DOS SANTOS, C.N., 2008. Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. **Virology**, 377:319-329.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)