

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

AVALIAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE

Eric Almeida Xavier

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, pelo programa de Pós-
Graduação em Imunologia Básica e Aplicada - Área de
concentração: Bioagentes Patogênicos.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

A reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, só serão permitidas para fins de estudo e pesquisa, desde que citado o nome do autor e com previa comunicação.

FICHA CATALOGRÁFICA

Eric Almeida xavier.

AVALIAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE

**/Eric Almeida Xavier ; Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana.
Ribeirão Preto, 2010.**

118 f. : il. : 30 cm

Dissertação (Mestrado **programa de Pós-Graduação em Imunologia
Básica e Aplicada. Área de concentração: Bioagentes Patogênicos.**) -
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2010.

1. Adaptação do Dengue Tipo 1 (DENV-1) – 2. *Flavivirus* – 3. Aumento da virulência – 4. Cinética da virulência – 5. Infecção em camundongos imuno competentes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eric Almeida xavier

AVALIAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, pelo programa de Pós-
Graduação em Imunologia Básica e Aplicada - Área de
concentração: Bioagentes Patogênicos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Instituição: -USP

Assinatura:-----

Prof^a.

Instituição: -USP

Assinatura:-----

Prof^a.

Instituição: -USP

Assinatura:-----

DEDICATÓRIA

A meu pai minha mãe e toda minha família.

**AVALIAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA INFECÇÃO
PELO VÍRUS DA DENGUE**

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana, orientador deste trabalho, que nos anos de convivência muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual, pela confiança pela amizade que sempre me proporcionou.

Aos professores, João Santana da Silva, Paulo Marcos da Matta Guedes e Luis Tadeu Moreis Figueiredo pelo constante apoio.

À Ana Cristina Silva Ferreira, secretária do programa de Imunologia Básica e Aplicada pela amizade e pelo permanente apoio.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa em Virologia, FMRP-USP, Soraya Jabur Badra, Sueli Aparecida Pereira Abramovicius, Dercilio Aparecido Pavaneli, Paulo Sergio Paulosso, Maria Aparecida Mendes, pela constante assistência técnica.

Aos meus amigos e colegas do laboratório Alberto ,Liz ,Vanessa, Telma, Rafael, Djalma de Souza , Flavia, Kelly, Leandro, , Denise, Natália, Carlos, Viviane, Mario, Regina, , Gleuciane, Alex, Aline, Maira, Mariana, Teresa, Emiliana, Rafael, Paula Renata, Cleber, pela amizade e tolerância.

Resumo

A dengue é a arbovirose (doença viral transmitida por artrópodes) mais difundida em países tropicais e subtropicais. Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que mais de 100 milhões de casos ocorrem anualmente em todo o mundo.

Com base em testes sorológicos, os vírus da dengue são classificados em quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). A infecção de humanos com qualquer um dos quatro sorotipos de dengue pode levar ao desenvolvimento de três formas clínicas principais; doença febril indiferenciada, febre clássica da dengue (FD) e dengue hemorrágica com ou sem choque (DHF/DSS).

Trabalhos anteriores ao usarem a linhagem de camundongos C57black/6 obtiveram resultados como hemorragia intraperitoneal e injúria ao fígado dos animais infectados, portanto foi de interesse estudar como se desenvolve a infecção por DENV-1 nestes animais. Então o objetivo principal foi estudar a infecção pelo DENV-1 em camundongos C57BL/6 inoculados via intraperitoneal. Foi analisada a presença do vírus DENV-1 em diferentes órgãos cérebro, Baco, fígado e rim além do soro dos animais C57 Black/6 imunologicamente competentes, pois trabalhos realizados anteriormente por diversos grupos de pesquisa da área tem resultados controversos mostrando que a detecção posterior do DENV seria dependente de fatores como carga viral, tipo de animal infectado e principalmente da cepa viral utilizada. Como principais conclusões de nosso trabalho os animais C57BL/6 selvagem infectados com o DENV-1 mochiisuki apresentaram carga viral detectável até o décimo sexto dia. O animal C57BL/6 selvagem pode ser usado como modelo experimental para infecção com DENV.

ABSTRACT

Dengue is the arbovirus (arthropod-borne viral disease) more widespread in tropical and subtropical countries. According to World Health Organization estimates that more than 100 million cases occur annually worldwide. Based on serologic tests of dengue viruses are classified into four antigenically distinct serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4). The infection of humans with any of the four dengue serotypes can lead to the development of three main clinical forms, undifferentiated febrile illness, classic dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever with or without shock (DHF / DSS). Previous work to use the strain of mice C57black / 6 obtained results as intraperitoneal hemorrhage and injury to the liver of infected animals, so it was of interest to study how it develops the DENV-1 infection in these animals. So the main objective was to study the DENV-1 infection in C57BL / 6 mice inoculated intraperitoneally. We analyzed the presence of DENV-1 in different organs brain, spleen, liver, kidney and serum from animals C57 Black/6 immunologically competent, as previous work by several research groups in the area is controversial results showing that the subsequent detection of DENV would depend on factors such as viral load, type of infected animals and especially the viral strain used. The main conclusions of our work in the C57BL/6 infected with DENV-1 mochiuki had detectable viral load until the sixteenth day. The animal C57BL/6 can be used as an experimental model for infection with DENV.

SUMÁRIO

1.Introdução-----	14
1.1 Doença-----	15
1.1.1 Diagnóstico-----	16
1.2 Vírus-----	18
1.2.1 Características da partícula viral-----	18
1.2.2 Características das proteínas virais-----	20
1.2.3 Ciclo de replicação viral-----	24
1.3. Classificação dos DENV-----	25
1.3.1 Sorotipos e genótipos de DENV-----	25
1.4. Patogênese da doença-----	27
1.4.1 Citocinas-----	29
1.5 Dengue no Brasil-----	31
1.6 Modelos animais-----	33
2 Justificativa-----	35
3 Objetivos-----	36
3.1 Geral-----	36
3.2Específicos-----	36
4 Material e métodos-----	37
4.1 Animais-----	38
4.1.2 Vírus-----	39
4.1.3 Infecção dos camundongos e processamento das amostras clínicas-----	39
4.2 Extração do RNA viral-----	40
4.2.1 Nested RT-PCR convencional-----	40
4.2.2 Detecção e titulação da carga viral por RT-PCR em tempo real-----	41
4.3Histologia-----	42
4.4 Determinação do volume plasmático e do numero de plaquetas e leucócitos-----	43
4.5 Quantificação de citocinas por ELISA -----	43
4.6 Cultura de células do baço-----	44
4.6.1 Detecção de citocinas intracelulares-----	44
4.7Análises estatísticas-----	45
5 Resultados-----	46
5.1 Identificação do vírus DENV-1 do estoque viral-----	47
5.1.2 Inoculação dos camundongos C57BL/6 com o DENV-1-----	48
5.2 Perfil de citocinas produzidas pelos camundongos C57BL/6 após infecção com o DENV-1-----	53
5.3 Histopatologia do fígado dos camundongos-----	61
5.3.1 Histopatologia do cérebro dos camundongos -----	66
6 Discussão-----	70
7 Conclusões finais-----	75

LISTA DE FOTOS E FIGURAS

Figura 1. Partícula viral-----	18
Figura 2. Estrutura do genoma viral indicando os sítios de clivagem da poliproteína viral-----	19
Figura 3. Organização estrutural da proteína E de DENV-3-----	21
Figura 4. Esquema mostrando a disposição da proteína E na bicamada lipídica do envelope viral-----	21
Figura 5. Ciclo de replicação viral -----	25
Figura 6. Identificação do vírus DENV-1 do estoque viral. -----	47
Figura 7. Cinética de virulência nos órgãos dos animais C57BL/6-----	50
Figura 8. Carga viral em cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1-----	50
Figura 9. Contagem de plaquetas dos camundongos infectados com DENV-1-----	52
Figura 10. Produção de $TNF\alpha$ em camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1--	53
Figura 11. Produção de $IFN\gamma$ em camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1--	54
Figura 12. Produção de IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1--	55
Figura 13. Gráfico de Produção de citocinas intracelulares-----	56
Figura 14. Produção de citocinas intracelulares-----	57
Figura 15. Cinética de viremia no soro dos animais C57BL/6 e deficientes de $IFN\gamma$ -----	58
Figura 16. Comparação da produção e citocinas no sétimo dia de infecção-----	59
Figura 17. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens (n= 22) e nocuate para $IFN\gamma$ (n= 10) infectados com DENV-1-----	60
Figura 18. Histologia do fígado dos camundongos não infectados (A) e infectados (B e C)-----	61
Figura 19. Contagem de núcleos nas lâminas de fígado dos camundongos infectados com DENV-1-----	63

Figura 20. Histologia do fígado dos camundongos nocaute para $IFN\gamma^{-/-}$ não infectados (A) e infectados (B)-----64

Figura 21. Media de 20 fotos da contagem de núcleos nas lâminas de fígado dos camundongos selvagem e nocautes infectados ou não com DENV-1-----65

Figura 22. Histologia de cérebro dos camundongos não infectados (A) e infectados (B e C)-----66

Figura 23. Contagem de núcleos nas lâminas de fígado dos camundongos selvagem e nocaute infectados ou não com DENV-1-----67

Figura 24. Histologia de cérebro dos camundongos nocaute para $IFN\gamma^{-/-}$ não infectados (A) e infectados (B)-----68

Figura 25. Media de 20 fotos da contagem de núcleos nas lâminas de cérebro dos camundongos selvagem e nocautes infectados ou não com DENV-1-----69

LISTA DE GRAFICOS E TABELAS

Tabela 1 .Modelos de animais utilizado em estudos com DENV.

Tabela 2. Carga viral determinada por RT-PCR em tempo real

Tabela 3. Hematócrito (Hct)%.

Tabela 4. Contagem de plaquetas dos camundongos infectados com DENV-1.

LISTA DE ABREVIATURAS

C57black/6-

DF - (do inglês - dengue fever) febre da dengue clássica

DHF - (do inglês - dengue hemorrhagic fever) febre hemorrágica do dengue

DSS – (do inglês - dengue shock syndrome)

DENV – vírus da dengue

PFU-Plaque forming unit

RT-PCR - (do inglês – Reverse transcriptase polimerase chain reaction) transcriptase reversa – reação em cadeia polimerase

PCR - (do inglês - polimerase chain reaction) reação em cadeia polimerase

cDNA – DNA complementar

RE – Retículo Endoplasmático

RNC5' – região não codificadora 5'

RNC3' – região não codificadora 3'

WT- linhagem de camundongo selvagem ou imunocompetente (C57black/6)

IFN- γ - interferon gama

IFN γ -/- animal deficiente em interferon gama

1. Introdução

1.1 Doença

A febre da dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus da dengue (DENV) e reconhecida como entidade clínica desde 1779 (SILER et al., 1926). O vírus foi isolado pela primeira vez em 1943 por Susumo Hotta (KIMURA & Hotta, 1944). O DENV é transmitido para homem pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*. Assim, Dengue trata-se de uma arbovirose transmitida por artrópodes.

A dengue apresenta-se em três formas clínicas principais; doença febril indiferenciada, febre clássica da dengue (FD) e dengue hemorrágica com ou sem choque (DHF/DSS) (PAHO, 1994).

A FD apresenta-se como uma enfermidade aguda febril autolimitada que perdura por aproximadamente 4 a 5 dias. A doença começa abruptamente, com febre elevada, dor retro-orbitária, cefaléia de grau variável, erupção maculopapular, dores musculares e articulares e náuseas. O paciente pode apresentar plaquetopenia e hemorragias de grau moderado. A DHF/DSS começa com a mesma sintomatologia inicial que corresponde à febre clássica porém, nos casos hemorrágicos, há um aumento da permeabilidade e extravasamento vascular e o nível de TNF-alpha pode estar aumentado nos pacientes com a forma mais grave. Estudos funcionais in vitro tem mostrado que distintos genótipos virais apresentam diferentes características de infecção celular, sugerindo que a virulência estaria relacionada com o genótipo viral (HALSTEAD, et al ., 1988 ;AQUINO V ,et al., 2006; TSAI J, et al., 2009).

Distintas cepas de DENV-2, isoladas de pacientes com graus variáveis da doença, replicam quantitativamente de maneira diferente em células LLC-MK2, leucócitos do sangue periférico, e células C6/36 (MORENS, et al., 1991; MANGADA & IGARASHI,

1998). Também, diversas cepas de DENV-2 variam na sua infectividade, in vitro, sobre um mesmo tipo celular dependendo do genótipo e do número de passagens (DIAMOND et al., 2000).

Sendo um flavivírus de polaridade positiva, o genoma viral consiste de uma fita simples de RNA com aproximadamente 11 kilobases (kb). Com base em testes sorológicos, 4 sorotipos antigenicamente distintos são conhecidos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gubler, 2002).

1.1.1 Diagnóstico

Os métodos sorológicos clássicos como inibição da hemaglutinação (HI), fixação de complemento (CF), ou neutralização (NT) podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção por dengue. Estes testes são realizados com amostras pareadas, uma colhida no início dos sintomas e outra na convalescência, sendo considerados positivos quando o título de anticorpos na fase de convalescência apresenta um aumento de quatro ou mais vezes quando comparado com o título observado na fase inicial da doença. Estes métodos não podem ser utilizados para diagnóstico precoce da doença e não são muito apropriados para estabelecer o sorotipo infectante devido a reações cruzadas, principalmente em pacientes com imunidade heteróloga (SRICHAIKUL & NIMMANNITYA.,2000) Devido à associação entre a infecção seqüencial com diferentes sorotipos e DHF/DSS, é importante distinguir uma infecção primária de uma infecção secundária. A HI é o método mais utilizado para distinguir entre infecção primária e secundária. Na infecção primária, os títulos séricos para DENV não devem superar 1250 em materiais obtidos após 7 dias de doença. Na infecção secundária, os

títulos séricos devem ser maiores ou iguais a 2500 (SHOPE, 1963). O diagnóstico laboratorial de rotina da Dengue é realizado atualmente por sorologia, principalmente pela detecção de IgM. O método mais aceito é o ensaio imunoenzimático de captura (Mac-ELISA) (BUNDO & IGARASHI, 1985, CHUNGUE et al., 1989, INNIS et al., 1989 and NOGUEIRA et al., 1992). A IgM aparece entre o quinto e o sétimo dia após início da febre e começa a diminuir depois de 1 a 2 meses; portanto, não pode ser utilizado para diagnóstico precoce da doença. O padrão ouro para diagnóstico específico de infecções por DENV é o isolamento viral, o qual é realizado utilizando sangue obtido de pacientes que apresentam uma evolução de até 5 dias após o início da febre. Linhagens celulares contínuas de *Toxorhynchites amboinensis* (TRA-284), *Aedes albopictus* (C6/36), e *Aedes pseudoscutellaris* (AP-61) são freqüentemente utilizadas para isolamento do vírus (KUNO et al., 1985). Após isolamento, o vírus é identificado e sorotipado, comumente, por imunofluorescência indireta utilizando anticorpos monoclonais sorotipo-específicos. Embora a amostra clínica seja obtida na fase aguda da doença, o resultado final da cultura celular pode sair em até 7 dias, impossibilitando o diagnóstico precoce. Para o diagnóstico rápido de infecções por dengue têm sido usadas RT-PCRs utilizando iniciadores (primers) sorotipo-específicos e análise dos amplicons em gel de agarose (DEUBEL et al., 1990; LANCIOTTI et al., 1992; BRONZONI et al., 2005). Porém, estes métodos são muito laboriosos, apresentam alto risco de contaminação cruzada e são de difícil implementação na rotina. Recentemente, vários protocolos de RT-PCR em tempo real foram desenvolvidos para diagnóstico específico da infecção por DENV (CALLAHAN et al., 2001; DROSTEN et al., 2002; HOUNG et al., 2001; CHUTINIMITKUL et al., 2005; SANTOS et al., 2008). A RT-PCR em tempo real não requer manipulação pós-amplificação, sendo por isso chamada de sistema fechado ou homogêneo. As principais vantagens deste sistema homogêneo

são: redução do tempo necessário para a realização do teste, baixo risco de contaminação com o produto amplificado e possibilidade de quantificação da carga viral, mais tem com principal desvantagem o alto custo.

1.2 Vírus

1.2.1 Características da partícula viral

O vírus Dengue pertence à família Flaviviridae, gênero Flavivirus (WESTAWAY et al., 1985). As partículas virais são esféricas, com 50 a 55 nm de diâmetro (Figura 1), constituídas por um nucleocapsídeo envolto por uma membrana bilipídica que constitui o envelope viral, no qual estão ancoradas glicoproteínas de superfície.

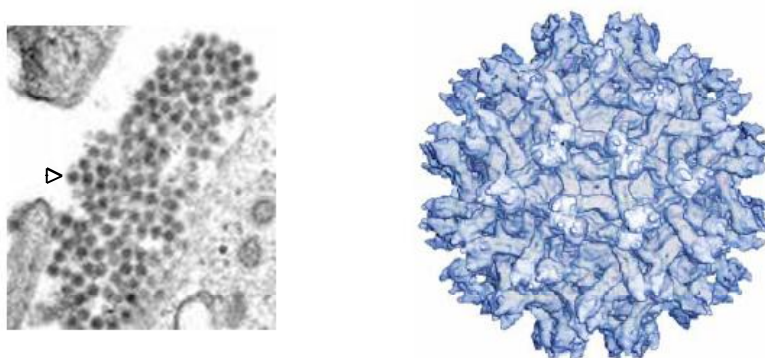


Figura modificada de MUKHOPADHYAY et al., 2005

Figura 1. Partícula viral. A) Micrografia eletrônica de DENV-2 em cultura celular, a seta indica uma partícula viral. B) Estrutura da partícula de DENV-2 revelado por cryoEM (cryo-electron microscopy) numa resolução de 16 Å (MUKHOPADHYAY et al., 2005).

O genoma do vírus Dengue consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11 kilobases (Figura 2). Este RNA possui um Cap (m7G5'ppp5' A) na sua extremidade 5', mas não contém cauda de polyA na extremidade 3'. O RNA viral possui uma única fase de leitura (open reading frame,

ORF), a qual codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares e virais em 3 proteínas estruturais (C, pré-M e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LINDENBACH & RICE, 2001; MUKHOPADYAY et al., 2005). Nas extremidades 5' e 3', flanqueando a ORF, existem duas regiões não codificadoras, RNC5' e RNC3', que apresentam aproximadamente 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem seqüências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de replicação, tradução e empacotamento viral.

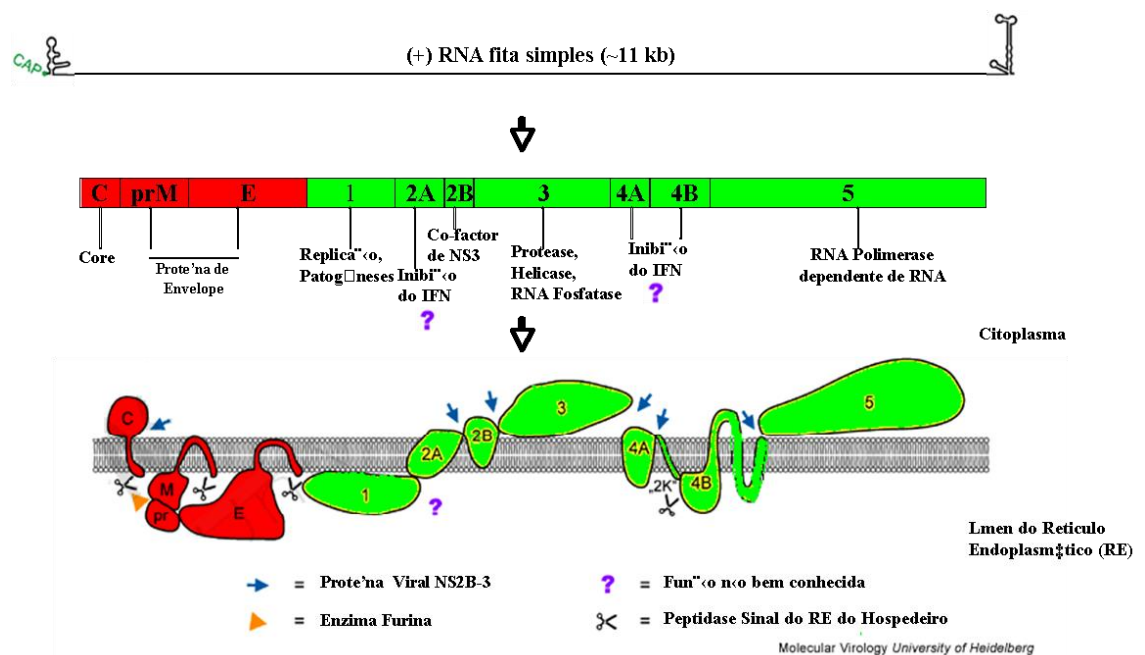


Figura modificada de University of Heidelberg

Figura 2. Estrutura do genoma viral indicando os sítios de clivagem da poliproteína viral, as proteínas representadas em vermelho irão compor a partícula viral e as representadas em verde são proteínas acessórias não estruturais que irão realizar diversas funções como com RNA polimerase e clivagens (Molecular Virology University of Heidelberg).

1.2.2 Características das proteínas virais

A proteína C que forma parte do nucleocapsídeo junto com o RNA viral, possui aproximadamente 11 kilodaltons (kDa) e é altamente básica. Os resíduos básicos estão concentrados nas extremidades N- e C-terminal e, provavelmente, atuam de forma cooperativa na ligação da proteína C ao RNA genômico do vírus. A glicoproteína pré-M (~26 kDa) encontrada no envelope viral de partículas imaturas é clivada pela enzima furina, residente no trans-Golgi. Assim, partículas virais maduras, apresentando a glicoproteína M (~8 KDa) são secretadas para o meio extracelular juntamente com a proteína “pré-M” (LINDENBACH & RICE, 2001; MUKHOPADYAY et al., 2005). A glicoproteína E é o principal componente da superfície do virion e também a principal molécula antigênica dominante responsável pela entrada do vírus na célula (ROEHRIG et al., 1998, LEITMEYER et al., 1999). A resolução da estrutura cristalográfica revelou que esta proteína se encontra organizada em três domínios funcionais (I,II,III) (Figura 3) (MODIS et al., 2005).

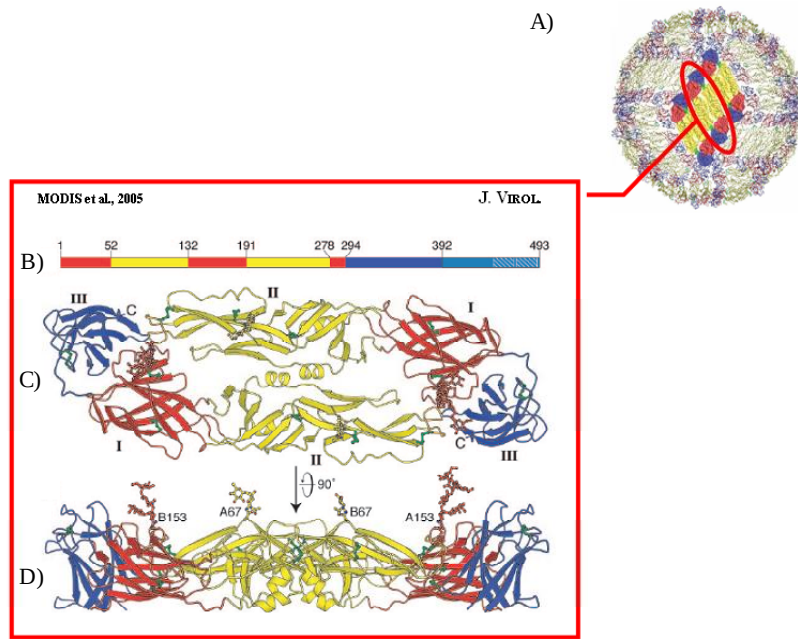


Figura modificada de Modis et al. 2005

Figura 3. Organização estrutural da glicoproteína E de DENV-3. A) Em destaque a estrutura dimérica da glicoproteína E em uma partícula viral madura de DENV-3. B) Localização dos aminoácidos nos domínios funcionais (domínio I em vermelho, domínio II em amarelo e o domínio III em azul). C) Estrutura tridimensional da glicoproteína E, mostrando os três domínios funcionais de DENV-3 (I, II e III). D) Indicação dos sítios de glicosilação da proteína E dimérica (A67/A153 e B67/B153) (MODIS et al., 2005).

A glicoproteína E encontra-se ancorada no envelope viral através de domínios transmembrana que são estruturas alfa-hélices antiparalelas (Figura 4).

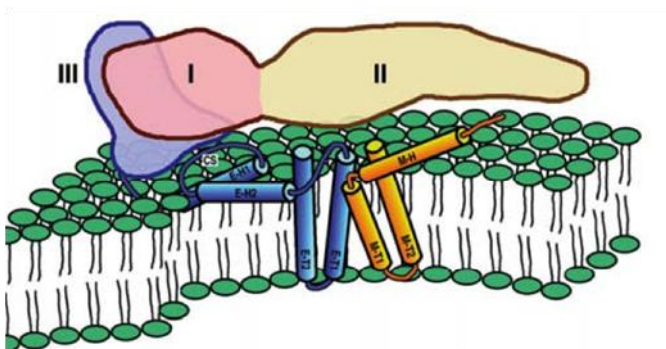


Figura modificada de ZHANG et al., 2003

Figura 4. Esquema mostrando a disposição da proteína E das proteínas transmembrana alfa-hélices na bicamada lipídica do envelope viral (ZHANG et al., 2003).

Acredita-se que os diferentes graus na afinidade de ligação dos anticorpos neutralizantes dirigidos contra distintos sorotipos virais, provavelmente, seja devido a variações na composição de um grupo de resíduos de aminoácidos encontrados na proteína E do vírus Dengue. MODIS et al., (2005) sugeriram que este grupo é composto por 56 aminoácidos não conservados e localizados na superfície viral. Estes resíduos incluem a maioria dos epítomos relacionados ao escape viral da neutralização mediada por anticorpos monoclonais sorotipo-específicos e dirigidos contra o domínio III da glicoproteína E do vírus Dengue.

O sequenciamento nucleotídico do gene da glicoproteína E é muito útil em estudos filogenéticos, os quais podem fornecer importantes informações sobre a epidemiologia viral e a correlação entre genótipos virais e a severidade da doença (TWIDDY et al., 2003). Por outro lado, análises destas seqüências poderiam ser utilizadas para estudar outros aspectos evolutivos do vírus, tais como a taxa de substituição nucleotídica, diversidade e pressão seletiva.

A glicoproteína viral não-estrutural NS1 (~46 kDa) quando expressa é encontrada ancorada à superfície da célula-alvo infectada e/ou solúvel intra/extracelular. NS1, membro na poliproteína viral, é clivada no lúmen do retículo endoplasmático (RE) pela ação de peptidases e proteases celulares a NS1 teria participação na replicação do RNA viral e, possivelmente, estaria envolvida na patogênese da doença (MODIS et al., 2005; BARONTI C, et al., 2010)

NS2A (~22 kDa) é uma proteína hidrofóbica, a qual acredita-se estar envolvida na inibição da ação do interferon do tipo 1 (IFN- alpha/ beta) do hospedeiro. NS2A/2B são clivadas por serino proteases celulares. NS2B (~14 KDa) é uma proteína de

membrana com 2 domínios hidrofóbicos os quais rodeiam uma região hidrofílica conservada. Esta proteína forma um complexo com NS3 que é necessário para a função de serina-protease de NS3 (MAZZON M, et al., 2009).

NS3 é uma proteína citoplasmática (~70 kDa) que se associa à membrana por interação com NS2B formando um complexo que irá atuar sobre várias atividades enzimáticas relativas ao processamento da poliproteína e à replicação do RNA viral (CHAMBERS, et al., 1990).

NS4A e NS4B (~16 kDa e 27 kDa) são proteínas hidrofóbicas que estão associadas à membrana do retículo endoplasmático com base em sua distribuição subcelular e interação com NS1, acredita-se que NS4A participe na replicação do RNA viral e também na inibição da ação da sinalização do IFN do tipo 1 do hospedeiro. (Molecular Virology University of Heidelberg).

NS5 (~103 KDa) é a maior e mais conservada proteína viral. Contém seqüências homólogas a RNA polimerases RNA dependentes de outros vírus de RNA de polaridade positiva. Dentre estas seqüências homólogas destaca-se o motif Gly-Asp-Asp (GDD). A NS5 também apresenta homologia com meltitransferases envolvidas na formação de cap do RNA (CHAMBERS, et al., 1990; MUKHOPADHYAY, et al., 2005; Molecular Virology University of Heidelberg).

1.2.3 Ciclo de replicação viral

O vírus entra em contato com as células através da ligação da glicoproteína E a receptores ainda desconhecidos da superfície celular (acompanhe a figura 5). Esta interação induz a entrada do vírus na célula por endocitose. Os endossomos formado contendo partículas virais fundem-se aos lisossomos da célula, levando a uma diminuição do pH intra-endossômico que potencializa mudanças conformacionais na proteína E, resultando em uma fusão do envelope viral com a membrana das vesículas endossomais e consequentemente, a desnudamento da partícula viral e liberação do genoma no citoplasma. Após a liberação do RNA no citoplasma, tem início a tradução e processamento da poliproteína através da maquinaria intracelular do hospedeiro; a replicase viral é formada a partir da interação das proteínas NS3 e NS5 que irão atuar sobre o RNA viral, provavelmente, auxiliadas por alguns fatores do hospedeiro. A replicação se inicia com a síntese da fita negativa de RNA (ssRNA-), a qual serve para a formação de uma fita dupla, a partir da qual são sintetizadas várias cópias de fitas positivas de RNA (ssRNA+). A montagem do virion acontece pela associação das fitas de RNA com proteínas C do nucleocapsídeo localizadas na superfície das membranas do RE. A proteína C junto com o RNA viral formam o nucleocapsídeo e este interage com a porção citoplasmática das glicoproteínas virais ancoradas na membrana do RE, formando assim o envelope viral e resultando na montagem das partículas virais por brotamento para dentro do lúmen do RE. Posteriormente, as partículas virais são liberadas da célula pela via exocítica (Figura 5) (LINDENBACH & RICE, 2001; MUKHOPADHYAY, et al., 2005).

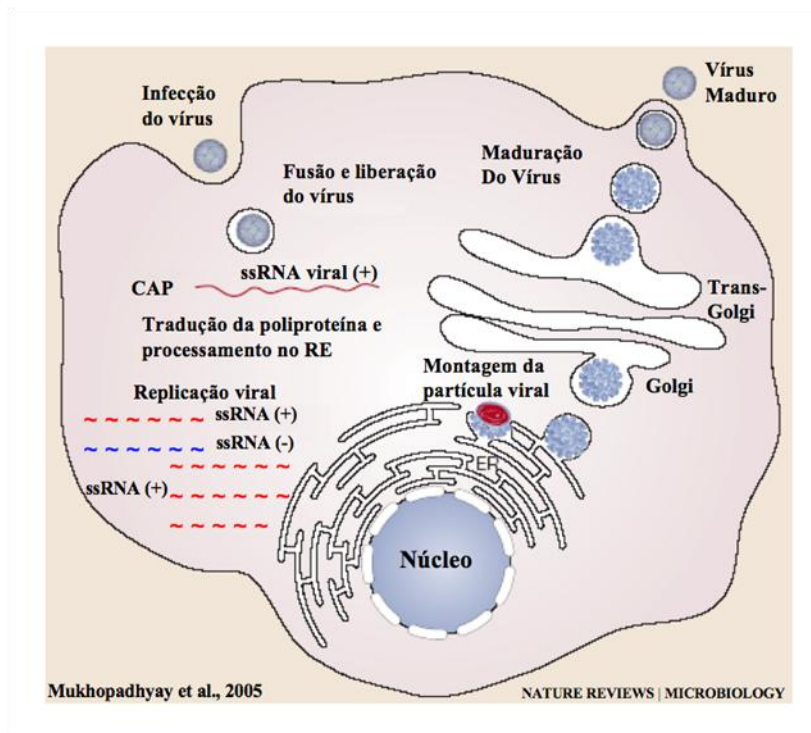


Figura modificada de MUKHOPADHYAY, et al., 2005

Figura 5. Ciclo de replicação viral. O vírus é endocitado, com a redução do pH dentro do fagossomo, o RNA viral é introduzido no citoplasma onde é traduzido no retículo endoplasmático rugoso, com tradução da RNA polimerase viral a fita negativa e produzida e a partir dela e fita mais fitas positivas que se unem as proteínas C do capcídio e as proteínas E e M do envelope, então a partícula viral é excretada pela via exocítica do Golgi.

1.3 Classificação dos DENV

1.3.1 Sorotipos e genótipos de DENV

Com base em testes de neutralização, os DENV foram classificados em 4 sorotipos antígenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (SCHERER WF, 1968). Variantes genéticas dentro de cada sorotipo têm sido identificadas e classificadas de diferentes formas, acompanhando o desenvolvimento da tecnologia. Estudos na década de 70 mostraram a existência de variação antigênica

dentro dos DENV-3, onde as cepas de Porto Rico foram diferentes das cepas da Ásia (RUSSEL & MCCOWN, 1972). Mais tarde, o método de “RNA fingerprinting” foi usado para identificação do sorotipo viral e para análises moleculares das variantes genéticas dentro de cada sorotipo (VEZZA et al., 1980; REPIK et al., 1983; TRENT, et al., 1983; TRENT, et al., 1989; TRENT, et al., 1990). Vários trabalhos, ao utilizarem análises antigênicas (MONATH et al., 1986), hibridação de cDNA-RNA (BLOCK et al., 1984, 1985), hibridação usando oligonucleotídeos (KERSCHNER et al., 1986) e digestão com enzimas de restrição de produtos de PCR (VORNDAM et al., 1994), mostraram a existência de variantes genéticas dentro de cada sorotipo. Com o desenvolvimento do seqüenciamento dos ácidos nucléicos e os estudos de diversidade genética foi possível sistematizar a classificação em grupos genômicos ou genótipos. Atualmente, são conhecidos diversos genótipos dentro de cada sorotipo viral. DENV-1 está constituído por cinco genótipos; o genótipo I está representado por vírus da América, da África e do sudeste da Ásia. O genótipo II inclui isolados de Sri Lanka; o genótipo III está representado por cepas do Japão; o genótipo IV inclui cepas do sudeste da Ásia, sul do Pacífico, Austrália e México; o genótipo V está representado por vírus de Taiwan e Tailândia (RICO-HESSE, 1990, GONCALVES et al., 2002). DENV-2 foi inicialmente classificado em cinco genótipos, mas estudos recentes indicaram a existência de um novo genótipo; assim os seis genótipos são denominados: Ásia I, Ásia II, Americano, Americano/Asiático, Cosmopolita e Selvagem (RICO-HESSE et al., 1990; LEWIS et al., 1993; TWIDDY et al., 2002). DENV-3 foi classificado por LANCIOTTI et al. (1994) em 4 subtipos ou genótipos. O genótipo I está representado por isolados de Indonésia, Malásia, Filipinas e algumas ilhas do Pacífico Sul; o genótipo II compreende vírus da Tailândia; o genótipo III está representado por isolados da Sri Lanka; e o genótipo IV inclui vírus de Porto Rico e Tahiti. WITTKKE et al. (2002)

sugeriram a existência de um quinto genótipo dentro do DENV-3 que inclui vírus das Filipinas e da China. DENV-4 inclui dois genótipos; o genótipo I está representado por isolados das Filipinas, Tailândia e Sri Lanka; o genótipo II inclui vírus da Indonésia, Tahiti, as ilhas do Caribe (Puerto Rico e República Dominicana), os países da América Central e América do Sul (LANCIOTT et al. 1997). Um terceiro genótipo, representado por vírus do genótipo selvagem foi identificado por WANG et al. (2000).

1.4 Patogênese da doença

No homem, a infecção por DENV, independente do sorotipo, produz imunidade permanente contra re-infecção pelo mesmo sorotipo causador da infecção, mas não contra outros sorotipos (SANGKAWIBHA et al., 1984). Estudos epidemiológicos têm identificado a infecção secundária (infecção por um segundo sorotipo) e a presença de anticorpos pré-existentes contra DENV como fatores de risco para desenvolvimento de DHF/DSS (BURKE et al., 1988). Entretanto, apesar do número grande de infecções secundárias em áreas endêmicas, uma pequena percentagem de casos evolui para DHF/DSS. Acredita-se que fatores ambientais, do hospedeiro e virais contribuem para o desenvolvimento da DHF/DSS (HALSTEAD, 1988; MONATH, 1994; LOKE et al., 2001; SPAULDING et al., 1999; MATHEW et al., 1998). A ausência de um modelo animal adequado têm dificultado a caracterização dos fatores envolvidos na patogenia viral. Entre os fatores dependentes do hospedeiro podemos citar a idade, a susceptibilidade genética, a infecção prévia e a imunidade heteróloga. HALSTEAD et al. (1970) propuseram a teoria de que indivíduos que sofrem infecção secundária por sorotipo diferente do envolvido na primo-infecção têm uma exacerbação da infecção imunologicamente mediada e desenvolvem uma resposta paradoxal e quadros mais

graves da doença. Os anticorpos da infecção primária não neutralizam outro sorotipo viral, pelo contrário, podem facilitar tanto a adsorção e entrada do vírion em células como macrófagos e monócitos. O vírus dentro destas células, evadem a degradação pelo fagolisossomo aumentando a taxa de replicação viral. Altos títulos de viremia foram demonstrados por VAUGHN et al. (2000) em indivíduos com infecção grave.

Estudos de epidemiologia molecular têm sugerido a importância dos fatores virais para o desenvolvimento de DHF/DSS. Por exemplo, apesar da presença de diversos sorotipos nas Américas, foi durante a epidemia de Cuba, em 1981, que o primeiro caso de DHF/DSS aconteceu. Este fato coincidiu com a introdução de um novo genótipo de DENV-2, o Asiático (RICO-HESSE, 1990). O genótipo americano nativo tem sido associado a uma doença leve, entretanto, a introdução do genótipo Asiático coincidiu com a aparição de DHF/DSS em 4 países sul-americanos (RICO-HESSE, et al., 1997; WATTS, et al., 1999). Estudos funcionais in vitro têm mostrado que distintos genótipos virais apresentam diferentes características de infecção celular, sugerindo que a virulência estaria relacionada com o genótipo viral. Distintas cepas de DENV-2, isoladas de pacientes com diversos graus de doença, produzem diferentes níveis de vírus infecciosos em células LLC-MK2, leucócitos do sangue periférico, e células C6/36 (MORENS, et al., 1991; MANGADA & IGARASHI, 1998). Também, diversas cepas de DENV-2 variam na sua capacidade de infectar in vitro o mesmo tipo de célula dependendo do genótipo e do número de passagens (DIAMOND, et al., 2000) LEITMEYER et al. (1999): seqüenciando o genoma completo de DENV-2 dos genótipos do Sudeste Asiático e do Americano diretamente do plasma de pacientes com FD e DHF/DSS, identificaram 3 regiões do genoma (proteína E, NCR 5' e NCR 3') que poderiam estar relacionadas com a patogenia viral. COLOGNA & RICO-HESSE. (2003) prepararam clones quiméricos infecciosos de DENV-2 dos genótipos do Sudeste

Asiático e do Americano substituindo as 3 regiões mencionadas acima e observaram que existia uma diminuição na liberação de vírus de macrófagos e células dendríticas quando a quimera possuía estruturas do genótipo Americano. Estes resultados sugerem que a região codificadora da proteína E e NCR 5' e NCR 3' teriam alguma influência na patogenia viral.

Nas últimas duas décadas, o DENV-3 tem causado epidemias inesperadas de DHF/DSS em Sri Lanka, Leste Asiático e América Latina. Um estudo filogenético realizado recentemente tem mostrado que o aumento de surtos de DHF/DSS tem coincidido com o aparecimento de uma variante do genótipo III de DENV3, a qual, provavelmente, surgiu na Índia e se espalhou pela África e América Latina (MESSER, LANCIOTT., 2003).

1.4.1 Citocinas

Estudos vêm demonstrando em humanos que nos casos de dengue hemorrágica (DHF) e síndrome do choque da dengue(DSS) as principais células alvo do vírus são os monócitos e não as células B ou T (BLACKLEY, 2007). Estudos demonstram que crianças com infecção secundária por dengue tem um risco maior de desenvolverem dengue hemorrágica. Ao analisar as amostras de culturas de monócitos do sangue periférico de 22 pacientes estimuladas com antígeno do dengue, 12 culturas responderam com produção de (IFN)-gamma e a produção de TNF-alpha foi detectada exclusivamente em 4 paciente mais graves que foram hospitalizados sugerindo uma severidade da doença quanto a produção de TNF (MANGADA, 2002). Outros trabalhos vem demonstrando que as células dendriticas também são um importante alvo do vírus,

sugerindo que o vírus induziria as células dendríticas a interagir com as células T e induzi-las a produzir citocinas de padrão Th1 e Th2 (HO et al., 2001). Estudos recentes demonstram que a severidade da doença também pode estar relacionada com o nível de apoptose celular de vários tecidos e órgãos podendo estar associada ao extravasamento vascular que é o que leva à morte dos pacientes mais graves (HOUGHTON-TRIVIÑO, et al ., 2010) Uma comparação das culturas de PBMCs (peripheral blood mononuclear cell) de pacientes com DF em comparação a de pacientes com DHF revelou que nas culturas de DHF o nível de apoptose é mais alto sugerindo que a severidade da doença pode estar relacionada ao nível de apoptose dos PBMC. A indução da apoptose celular não foi induzida somente pelo DENV mais por citocinas pró-inflamatórias indutoras de apoptose como TNF-alpha, e IL-1beta. O aumento da taxa de apoptose também explicaria os maiores níveis virais nos pacientes DHF.(JAIYEN, 2009). Portanto são vários os fatores que vem a influenciar na virulência do dengue em humanos, em camundongos experimentos demonstram que os animais nocautes no receptor de IFN do tipo 1 e 2 (alfa ,beta e gama) exibem paralisia e morem durante a infecção primária pelo dengue enquanto os animais deficientes em células B e T, RAG1 e RAG2 nocautes, podem resolver a infecção primária pelo dengue (SHRESTA, 2004). Novamente, demonstrando agora em camundongos a importância dos IFNs no controle da infecção pelo vírus dengue.

1.5 Dengue no Brasil

Nos últimos 20 anos, têm ocorrido diversas epidemias de dengue em todas as regiões do Brasil devido à disseminação do vírus e do vetor transmissor.

Na primeira epidemia de dengue no Brasil foi detectado o sorotipo-1 e começou numa cidade vizinha ao Rio de Janeiro em Março de 1986. No mesmo ano, o vírus chegou ao Rio de Janeiro, e foi o começo de uma epidemia explosiva com 95.000 casos notificados e aproximadamente 3 milhões de infectados (SCHATZMAYR, et al., 1986; FIGUEIREDO, et al., 1990). Esta epidemia chegou aos estados do nordeste e do centro-oeste do Brasil entre 1986 e 1987 (FUNASA, 2002; VASCONCELOS, et al. 1995). Entre 1990 e 2002, foram notificados casos de DENV-1, praticamente, em todas as regiões do Brasil (VASCONCELOS, et al. 1995). Em Abril de 1990, começou a primeira epidemia de DENV-2 na cidade do Rio de Janeiro (NOGUEIRA, et al., 1990). Nesta epidemia foram notificados 17.000 casos com 2% destes apresentando DHF/DSS. Desde então, epidemias ocasionadas por DENV-2 têm sido notificadas em praticamente todas as regiões do Brasil (FUNASA, 2002). DENV-3 foi isolado pela primeira vez em 1999 a partir de um paciente que retornou de uma viagem a Nicarágua, sugerindo que em breve o vírus poderia chegar ao Brasil. Isto aconteceu em Janeiro de 2001 quando ocorreu o primeiro surto no Rio de Janeiro (NOGUEIRA, et al., 2001, MIAGOSTOVICH et al., 2002). Este primeiro surto foi seguido de uma grave epidemia de dengue registrada no município do Rio de Janeiro, tendo seu pico entre janeiro e fevereiro de 2002. No período de 1 de janeiro de 2001 a 22 de junho de 2002 foram notificados 81327 casos de FD e 958 casos de DHF sendo que 54 casos foram a óbito (CASALI et al., 2004) o motivo para tantos surtos no Rio de Janeiro poderia ser

explicado por ser uma região quente e com um grande fluxo portuario. PASSOS et al. (2004) ao analisarem os 362 casos de dengue no Rio de Janeiro durante a epidemia de 2001/2002, com /DSS, isolamento viral confirmado laboratorialmente, observaram que a maioria (238 casos) pertencia ao sorotipo 3, sendo que os sorotipos 1 e 2 foram observados em 62 casos cada um. Nesse mesmo trabalho, os autores observaram que indivíduos infectados com o DENV-3 apresentaram sintomatologia mais severa, sugerindo maior virulência deste sorotipo. A alta susceptibilidade da população a este novo sorotipo, infecções prévias pelo sorotipo 1 ou 2 e a virulência da cepa podem justificar a dimensão desta epidemia e sua gravidade. Após a epidemia de 2001/2002 o DENV-3 rapidamente se espalhou pelas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil (Fundação Nacional de Saúde, 2002). Os genótipos de DENV-3 circulantes no Brasil são do tipo I e III (MIAGOSTOVICH, et al., 2002, AQUINO et al., 2006, ANATRIELLO et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2008).

A primeira notificação de DENV-4 no Brasil foi no estado de Roraima em 1982, porém, este vírus não se disseminou no país. Entretanto, no ano de 2008 foram detectados três casos autóctones de DENV-4 na cidade de Manaus, Amazonas, sugerindo que uma epidemia ocasionada por este vírus pode ocorrer a qualquer momento (FIGUEIREDO et al., 2008). Em 2007, 559.954 casos de dengue foram notificados, sendo que 1.541 foram classificados como DHF/DSS e 158 evoluíram para óbito (SVS/MS, 2007).

1.6 Modelos animais

A falta de modelos animais para o estudo de uma infecção que mimetize o que acontece em humanos é uma das grandes dificuldades encontradas para se estudar a patogenia do vírus Dengue. De acordo com o objetivo do estudo, diferentes linhagens de animais podem ser utilizadas (Tabela 1) (YAUCH & SHERESTA, 2008).

Tabela 1. Modelos de animais utilizado em estudos com DENV

Tabela 1 Modelos animais para infecção com DENV			
Camundongo	DENV inoculação	característica/Sintoma	Referencia
Camundongos-humanos quimeras			
SCID-hu-PBL	DENV1 $9 \times 10^{4-5}$ PFU i.p.	Vírus no soro de alguns camundongos	Wu et al. (1995)
SCID-K562	DENV2 10^7 PFU i.t.	Vírus em tumor, soro, cérebro, intestino, fígado, rim, bazo e paralisia	Lin et al. (1998)
SCID-HepG2	DENV2 10^6 PFU i.p.	Vírus no soro, cérebro, fígado, paralisia, trombocitopenia e elevação do hematócrito	An et al. (1999)
SCID-HuH-7	DENV4 10^4 PFU i.t.	Vírus em, soro, cérebro, fígado,	Blaney et al. (2002)
NOD/SCID-human CD34*	DENV2 $10^{4.7}$ PFU s.c.	Vírus em, soro, fígado, pele, febre e trombocitopenia	Bente et al. (2005)
RAG2 ^{-/-} γc ^{-/-} -human CD34*	DENV2 10^6 IU i.p. + s.c.	Vírus em, soro, f, febre e resposta de anticorpo humano	Kuruvilla et al. (2007)
Imunodeficientes			
AG129	DENV2 10^6 PFU i.p.	Vírus em, soro, cérebro e bazo	Johnson and Roehrig (1999)
AG129	DENV2 (PL046) 10^7 PFU i.v.	Paralisia	Shresta et al. (2006)
AG129	DENV2 (D2S10) 10^7 PFU i.v.	Extravasamento vascular e morte rápida mediada por TNFα	Shresta et al. (2006)
A/J	DENV2 10^8 PFU i.v.	Vírus no soro, trombocitopenia e paraplegia temporária	Huang et al. (2000)
A/J	DENV2 10^8 PFU i.v.	Hematócrito elevado, e diminuição leucocitária	Shresta et al. (2004a)
STAT1 ^{-/-}	DENV2 10^5 PFU i.p. + i.c.	S.C. Hemorragia intestinal, extravasamento vascular e paralisia	Chen et al. (2008)
Imunocompetente			
C57BL/6	DENV2 $4-8 \times 10^7$ PFU i.d.; DENV2 $1-3 \times 10^9$ PFU i.d.	S.C. hemorragia, trombocitopenia e hemorragia sistêmica	H.C. Chen et al. (2007)
C57BL/6	DENV2 10^8 PFU i.v.	Dano ao fígado	Chen et al. (2004)
BALB/c	DENV2 10^4 TCID ₅₀ i.p.	Dano ao fígado	Paes et al. (2005)

Abreviaturas PFU, plaque-forming unit; i.p., intraperitoneal; i.t., intratumor; s.c., subcutaneous; i.v., intravenous; IU, infectious units; WBC, white blood cell count; TCID, tissue culture infectious dose.

Modificado de (YAUCH & SHERESTA, 2008).

Os modelos murinos existentes podem ser divididos em modelos de animais imunodeficientes, suscetíveis ou resistentes à infecção por DENV e, modelos imunocompetentes que responderão ao vírus de formas diversas dependendo assim de fatores virais e das características desses animais. Os modelos animais suscetíveis à infecção mais usados em experimentos com DENV são os camundongos imunodeficientes devido à ausência endógena de Interferon do tipo-1 (IFN α/β -/-), Interferon do tipo-2 (IFN γ -/-) ou dos receptores destas citocinas (SHRESTA, 2004, SHRESTA et al., 2006 e JOHNSON & ROEHRIG, 1999). Os animais deficientes nos diferentes tipos de IFN são altamente suscetíveis ao vírus porque a resolução da infecção por dengue é altamente dependente desta citocina produzida inata (SHRESTA, 2004). Portanto, o principal motivo para a escolha do animal IFN-/- em nosso trabalho foi a possibilidade de comparar a taxa de infecção nestes animais com os animais selvagens e, usá-los como pela imunidade controles suscetíveis a infecção pois em tese se ao animais C57BL/6 forem infectados os animais imunodeficientes em IFN- γ terão uma taxa de infecção mais elevada . Entre os modelos animais imunocompetentes, os camundongos C57BL/6 mostraram algumas características da dengue quando infectados com DENV-2 como hemorragia, extravasamento de líquidos e trombocitopenia (CHEN, 2004 e CHEN,et al 2007). Portanto, este foi um dos principais motivos para a escolha do animal C57BL/6 em nosso trabalho. Além

disso, há modelos de animais imunodeficientes resistentes ao virus como os animais deficientes em iNOS ou em p47phox, um componente citosólico da NADPH oxidase , como também animais tratados com inibidores da oxidase tem uma redução na hemorragia dos tecidos nos animais infectados pelo DENV mostrando que os RNS e ROS tem um papel importante no desenvolvimento da doença como descrito por (YEN , 2008).

2 Justificativa

Trabalhos anteriores ao usarem a linhagem de camundongos C57black/6 obtiveram resultados como hemorragia intraperitoneal e injúria ao fígado dos animais infectados, portanto foi de interesse estudar como se desenvolve a infecção por DENV-1 nestes animais. Além disso não existe no mercado um modelo animal que venha a suprir todas as necessidades dos estudos com DENV, então o desenvolvimento de cepas adaptadas a determinadas linhagens de camundongos pode ser uma saída para induzir sintomas da dengue em animais semelhantes aos sintomas da dengue em humanos o que seria essencial para o estudo de medicamentos ou substâncias antivirais e pesquisas de virulência e adaptação viral.

3. Objetivos

3. Objetivos

3.1 Geral

Estudar a infecção pelo DENV-1 em camundongos C57BL/6 inoculados via intraperitoneal.

3.1.1 Específicos

1. Avaliar a capacidade do DENV-1 de infectar os camundongos C57BL/6.
2. Analisar a cinética de infecção em amostras do soro, baço, fígado, rim e cérebro.
3. Avaliar possíveis alterações laboratoriais (hematócrito e hemograma).
4. Avaliar a produção de citocinas IL-10, IFN- γ e TNF- α .
5. Avaliar possíveis alterações histológicas no fígado e no cérebro.

4. Material e métodos

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão preto (FMRP-USP) e deficientes (nocaute) para a citocina interferon gama ($\text{IFN}\gamma^{-/-}$) background C57BL/6, com idade cerca de 3 semanas, cedidos pelo professor Dr. João Santana da silva (FMRP-USP) Imunologia Básica e Aplicada (IBA) o numero de animais utilizados em cada dia de experimento esta indicado nas legendas das figuras.

4.1.2 Vírus

Um estoque de DENV-1 (cepa Mochizuki) isolado de paciente cedido pelo laboratório do professor Dr. Victor Hugo Aquino Quintana .Centro de Pesquisa em Virologia (CPV) foi preparado por inoculação via intracerebral em camundongos recém nascidos. Após 5-7 dias, quando os sintomas de encefalite apareceram, os camundongos foram sacrificados com éter em capela de fluxo. Os cérebros foram retirados e macerados, separadamente, em 1 ml de PBS e centrifugados à 1300 RPM por 5 minutos. Os sobrenadantes foram inseridos em tubo cônico de 15 ml, homogeneizados e aliquotados em tubos de 1,5 ml e congelados à -70°C. O estoque viral apresentou um título de $7,2 \times 10^8$ PFU/ml, determinado pelo método de RT-PCR em tempo real.

4.1.3 Infecção dos camundongos e processamento das amostras clínicas

Os animais selvagens foram inoculados via intraperitoneal com $7,2 \times 10^7$ PFU do DENV-1. Os camundongos do controle de sobrevivência foram infectados com uma mistura de PBS e sobrenadante de cérebro de camundongos recém nascidos de volume semelhante ao volume utilizado nos animais infectados. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical nos dias 2, 4, 7, 10, 16 e 21 para obtenção das amostras de sangue, cérebro, fígado, rim e baço. O sangue foi colhido em tubo contendo ou não anticoagulante para obtenção de plasma ou soro, respectivamente. Uma metade do cérebro e fígado foi fixado em solução neutra de 4% de formalina por um período mínimo de 24 horas e, em seguida, embebidos em parafina e a outra metade, macerada com 1 ml de PBS. Os órgãos macerados foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante estocado à -70°C.

Para análise da participação do IFN γ na patogênese da dengue no modelo animal. Os camundongos IFN γ ^{-/-} (n=14) foram infectados intraperitonealmente com DENV-1 7.2×10^7 PFU/ml. Após 7 dias, quatro camundongos de cada grupo foram sacrificados para obtenção de amostras de sangue, cérebro, fígado, rim e baço para a realização da cinética viral em tais órgãos. Como controle foram utilizados quatro camundongos inoculados com PBS via IP. Os camundongos restantes (n=10) foram observados por 21 dias para análise da sobrevivência.

4.2 Extração do RNA viral

O RNA viral foi purificado a partir de 140 μ l de soro ou de sobrenadante dos órgãos dos animais utilizando QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Alemanha), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA viral foi suspenso em 80 μ l de água DPC livre de RNase.

4.2.1 Nested RT-PCR convencional

O protocolo utilizado foi aquele descrito por BRONZONI et al., 2005. A mistura de reação para a síntese de cDNA continha 10 μ l de RNA, 0,125 mM de dNTP e 0,75 μ M de cFG2. A mesma foi incubada a 95°C por um minuto e rapidamente resfriada em gelo para em seguida, adicionou-se 200 U da transcriptase reversa (Superscript, Invitrogen™), 4 μ l do tampão 5X (250mM Tris-HCL [pH 8,3], 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 37,7 U de inibidor de RNase (Amersham Biosciences, EUA), 5 μ M de DTT e água livre de DNase/RNase até um volume 20 μ l. Foi então incubada a 42°C por 1 hora e a 85°C por

5 min. A mistura de reação da PCR contendo 2 µl de cDNA, 0,1 mM de dNTP, 0,3 µM de sFG1, 0,3 µM de cFG2, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Patinum® Taq DNA polymerase, Invitrogen), 5 µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl), e 2 mM de MgCl₂ num volume final de 50 µl foi amplificada em termociclador (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, USA) como segue: 95oC por 2 min seguido de 30 ciclos a 95oC, 20 seg; 53oC, 45 seg; e 72oC, 2 min, com uma extensão final a 72oC por 5 min. A mistura de reação da segunda etapa conteve 0,5 µl do produto da primeira etapa, 2 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Patinum® Taq DNA polymerase, Invitrogen), 5 µl do seu tampão 10X (200mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl), 0,05 mM de dNTP, e 0,3 µM de cada primer num volume final 50 µl. A mistura foi submetida à temperatura inicial de 94oC por 2 min e em seguida a 25 ciclos a 94oC, 20 seg; 53oC, 45 seg; e 72oC, 2 min, com uma extensão final a 72oC por 5 min no Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, USA). Com este produto foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,8% seguida de coloração com brometo de etídio e análise sob luz ultravioleta (LUV).

4.2.2 Detecção e titulação da carga viral por RT-PCR em tempo real

Para a realização do teste foi utilizado protocolo descrito por Dos Santos e colaboradores (2008). A mistura de reação continha 12,5 µl 2X SYBR green, 0,5 µl SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix, 5µl de RNA, 0,4 µM de cada um dos primers sense 5'UTR-S (AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA) e complementar 5' UTR-C (CGC GTT TCA GCA TAT TGA AAG), os quais geram produtos amplificados de 120 pares de base, e água destilada livre de DNase/RNase até volume

final de 25 µl. A amplificação foi realizada em termociclador SmartCycler Software (Cepheid, USA) da seguinte forma: 50°C por 20 minutos, 95°C por 3 minutos, e 45 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos, 60°C por 40 segundos, e 72°C por 30 segundos. Para determinar a especificidade do produto amplificado foi calculada a temperatura de melting (T_m) através da análise da curva de dissociação que foi construída aquecendo o produto de amplificação de 60°C a 95°C a uma velocidade de 0,2°C/segundo. O título viral foi determinado por RTPCR em tempo real como descrito anteriormente por Dos Santos et al., 2008).

4.3 Histologia

Para a análise histológica os tecidos fixados foram desidratados gradativamente em alcoóis, seguida de diafinilização com xilol e impregnação em parafina com inclusão. Cortes tissulares seriados, com espessura de 3µm, foram obtidos em micrótomo e estendidos em banho histológico a 50°C. Em seguida, os cortes foram montados em lâminas pré-tratadas com silano e secos em estufa a 58°C por duas horas e, logo, corados em hematoxilina e eosina. A análise histológica dos cortes tissulares foi realizada por microscopia ótica que visou basicamente a análise da presença e localização de células inflamatórias no cérebro e fígado dos animais infectados e controles. Adicionalmente, os cortes foram fotografados e analisados pelo programa ImageJ Launcher de Ales Kladnik (www.macbiophotonics.ca/imagej/installing_imagej.htm) para contagem dos núcleos celulares.

4.4 Determinação do volume plasmático e do numero de plaquetas e leucócitos

Para as análises hematológicas foi utilizado sangue coletado em tubos contendo anti-coagulante (citrato de heparina) Para determinação do volume plasmático, o sangue foi transferido para um capilar de microhematócrito (Perfecta, Brasil) e centrifugado por 5 minutos a 11000 rpm em uma centrifuga de hematócrito (QUIMS, Brasil), sendo a leitura realizada segundo recomendação do fabricante. Para contagem de plaquetas, o sangue foi diluído na razão 1/200 em solução aquosa de 1% de oxalato de amônia, para lise de hemácias, contendo duas gotas de azul de metileno. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer por microscopia óptica. O número de plaquetas encontrado foi multiplicado por 2.000, obtendo-se assim, o número de plaquetas/mm³ de sangue.

4.5 Quantificação de citocinas por ELISA

A produção de citocinas foi avaliada no soro dos camundongos infectados. Para tal, os camundongos foram infectados com $1,4 \times 10^7$ PFU do DENV-1. Um numero de quatro animais foi sacrificado a nos dias 2 ,4 ,7, 10, 16 e 21 após a infecção, os animais foram sacrificados para obtenção do soro e baço.

Para a verificação da produção de citocinas no soro. As amostras de soro foram adicionadas a frascos contendo PBS (50 mg/ml) com um coquetel inibidor de protease (Complete, Roche).As amostras foram centrifugadas e os supernadantes coletados para

a quantificação de citocina. os conjuntos de ELISA foram IL-10, IFN- γ e TNF- α . o nível de citocina no soro foram mensurados por um kit produzido por (R&D, Minneapolis, MN, USA) e os procedimentos foram de acordo com as especificações dos fabricantes. a densidade óptica foi mensurada a 450 nm. Os resultados são expressos em picogramas por milímetro (pg/ml). Os limites de sensibilidade para os diferentes ensaios foram os seguintes: IL-10, e TNF- α : 15 pg/ml; IFN- γ : 50 pg/ml.

4.6 Cultura de células do baço

O baço de 8 animais C57Bl/6 infectados após 7 dias e de 4 animais não infectados foram extraídos e cultivados em câmara de fluxo estéril em placas de petri a uma concentração de (5×10^6) células/ml a um volume final de 0.5 ml por 48 horas e estimuladas 4 h com PMA (4ng/poço) e ionomicina (100ng/poço),

4.6.1 Detecção de citocinas intracelulares.

As culturas de células do baço foram lavadas com PBS gelado e as amostras de células a uma concentração de 5×10^5 células por tubo foi incubada por 30 minutos a 4°C com 0.5 μ g de anti-CD16/CD32 mAb (FC block), então foi adicionado 0.5 μ g of PERCP- or FITC- de anticorpos marcados anti CD3, CD4 e CD8 (BD Pharmingen, San Diego, CA) ficando mais 30 min a 4°C no escuro. para detectar as citocinas intracelulares IL-17, IL-10, TNF- α e IFN- γ , as células foram fixadas com solução de cytofix e cytoperm por 15 min a temperatura ambiente, lavadas e então coradas com anticorpos marcados FITC-, APC- or PE a 4°C no escuro e incubado overnight. subsequentemente as células foram lavadas duas vezes e suspensas em 200 μ L of PBS/1% formaldehydo. Para cada ensaio 50,000 eventos foram adquiridos usando o aparelho FACSCanto II (BD). e os

dados foram analisados usando o FlowJo software. Os dados foram exportados do histograma e foram processados no Software prisma para análises estatísticas e gráficos.

4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas com o software Prisma (versão 5.0cx; GraphPad Software, Inc., San Diego, Calif.). as análises estatísticas dos resultados foram realizadas com o Microsoft Excel X (Microsoft Corporation, Seattle, Wash). As análises das fotos em um aumento de 400X (H & E Staining) foram feitas com o software ImageJ (National Institutes of Health). as análises estatísticas foram feitas usando o Student's *t*- or Chi-square-test. $P < 0.05$ foram considerados significativos.

5 .Resultados

5.1 Identificação do vírus DENV-1 do estoque viral

Uma alíquota do estoque viral foi utilizada para confirmação do sorotipo viral pela técnica de RT-PCR descrita por Bonzoni et al. (2005). A Figura 1 mostra um produto de amplificação de 472 pares de bases correspondente ao tamanho do amplicon gerados pelos primers flanqueadores específicos para DENV-1

Figura 6. Estoque viral

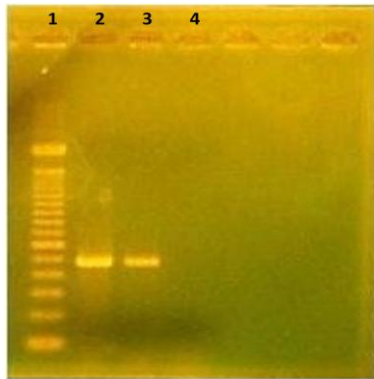


Figura 6. A coluna 2 mostram o produto de amplificação por RT-PCR a partir do estoque de DENV-1. Coluna 3, controle positivo da reação com DENV-1 oriundo de células C6/36. A coluna 4 mostra o controle negativo da reação . Coluna 1, marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen, EUA).

5.1.2 Inoculação dos camundongos C57BL/6 com o DENV-1

Para analisar se os camundongos eram suscetíveis à infecção, 24 animais foram inoculados via intraperitoneal com $7,2 \times 10^7$ PFU de DENV-1. Nos dias 2, 4, 7, 10, 16 e 21 após infecção, quatro camundongos foram sacrificados para determinação da carga viral em amostras de sangue, cérebro, fígado, rim e baço. A Tabela 2 mostra os resultados da carga viral, determinada por RT-PCR em tempo real. O vírus foi detectado do dia dois até o dia 16 após infecção. O pico da carga viral no sangue foi observado no dia 10 após infecção viral (Figura 7). A maior carga viral foi observada no cérebro dos camundongos no décimo dia de infecção (Figura 8).

Tabela 2. Carga viral determinada por RT-PCR em tempo real em fígado, cérebro, rim baço e soro de camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1.

Amostras	Carga viral (PFU/ml)					
	Dias após infecção					
	2	4	7	10	16	21
Sangue	0,87	4,2	5,08	34,11	3,13	0
Fígado	0,034	3.4	15,17	0,89	0.98	0
Baço	0,11	18,5	15,95	13,99	0,095	0
Rim	0,13	2,5	3	4,48	0,026	0
Cérebro	3,57	0,5	26,73	4168	0,011	0

Tabela 2. Mostra que as maiores cargas virais estão entre o sétimo e o décimo dia após a infecção. Um número de quatro animais foi sacrificado em cada dia de experimento.

Figura 7. Cinética de virulência nos órgãos dos animais C57BL/6

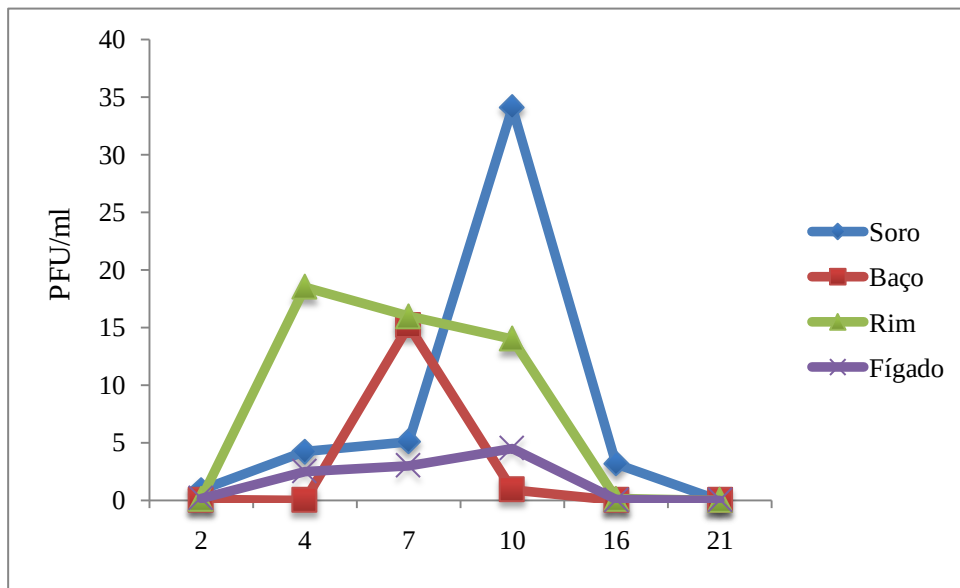


Figura 7. Carga viral determinada por RT-PCR em tempo real no fígado, rim, baço e soro de camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1. Um número de quatro animais foi sacrificado em cada dia de experimento.

Figura 8. Carga viral em cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1

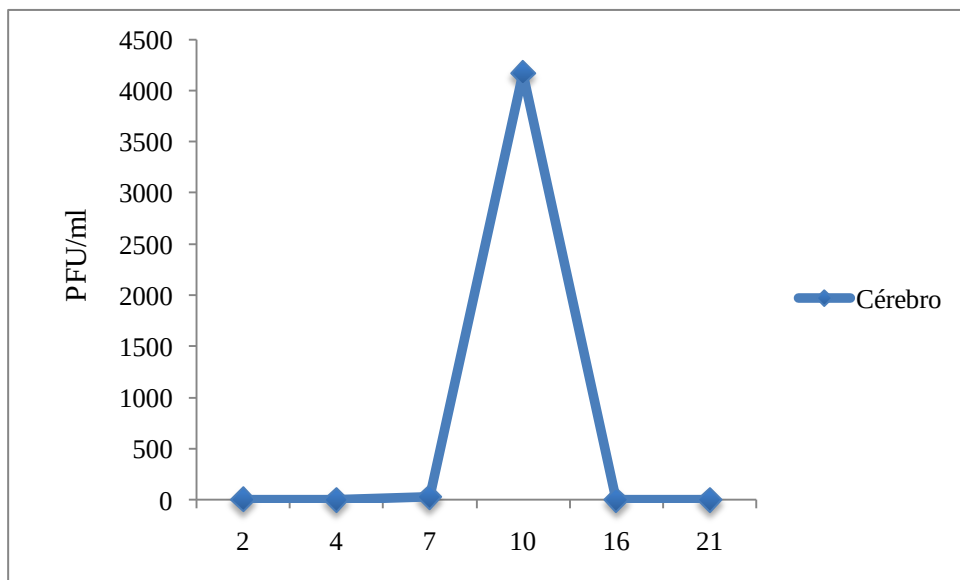


Figura 8. Carga viral determinada por RT-PCR em tempo real em cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1. Um número de quatro animais foi sacrificado em cada dia de experimento.

Volume plasmático e plaquetas

Para determinar o volume plasmático e plaquetas, quatro camundongos C57BL/6 foram sacrificados nos dias 2, 4, 7, 10, 16 e 21. O hematócrito dos camundongos mostrou que houve um aumento significativo entre o quarto e o décimo dia de infecção (Tabela 3).

Tabela 3. Hematócrito (Hct)%

Camundongos	Hematócrito (Hct)%						
	Dias após a infecção						
	0	2	4	7	10	16	21
1	44	44	51	55	65	46	45
2	45	42	52	61	62	57	43
3	46	48	44	61	69	42	44
4	45.5	42	68	68	62	46	46

Tabela 3. Os camundongos apresentaram uma diminuição significativa do Hematócrito entre os dias 7 e 10 após infecção. Um número de quatro animais foi sacrificado em cada dia de experimento.

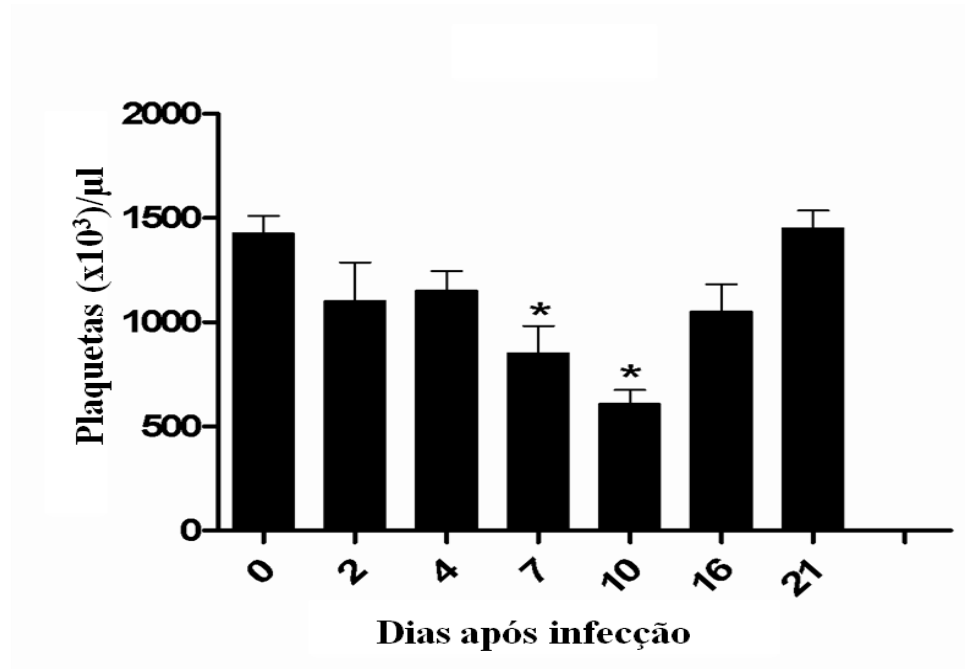
Figura 9. plaquetas

Figura 9. Contagem de plaquetas dos camundongos infectados com DENV-1. *Diferença significativa quando comparado com o número de plaquetas no dia zero ($p < 0,05$). Um número de quatro animais foi sacrificado em cada dia de experimento.

Tabela 4. Contagem de plaquetas dos camundongos infectados com DENV-1.

Camundongos	Plaquetas (x10 ³)/μL						
	Dias após a infecção						
	0	2	4	7	10	16	21
1	1500	1000	1200	1100	500	1300	1500
2	1400	1600	1400	1000	500	1200	1500
3	1600	1100	1000	500	800	1000	1600
4	1200	700	1000	800	600	700	1200

Tabela 4. Os camundongos apresentaram uma diminuição significativa de plaquetas nos dias 7 e 10 após infecção. Um número de quatro animais foi sacrificado em cada dia de experimento.

5.2. Perfil de citocinas produzidas pelos camundongos C57BL/6 após infecção com o DENV-1

Os camundongos foram infectados como mencionado anteriormente e sacrificados nos dias 2, 4, 7, 10, 16 e 21 após infecção. Quatro animais foram sacrificados em cada dia para obtenção do soro e baço para quantificação das seguintes citocinas: TNF, IFN- γ e IL-10. No soro, os animais infectados apresentaram um aumento significativo de produção de TNF- α nos dias 7 e 10 após infecção (Figura 10).

Figura 10. Produção de TNF- α

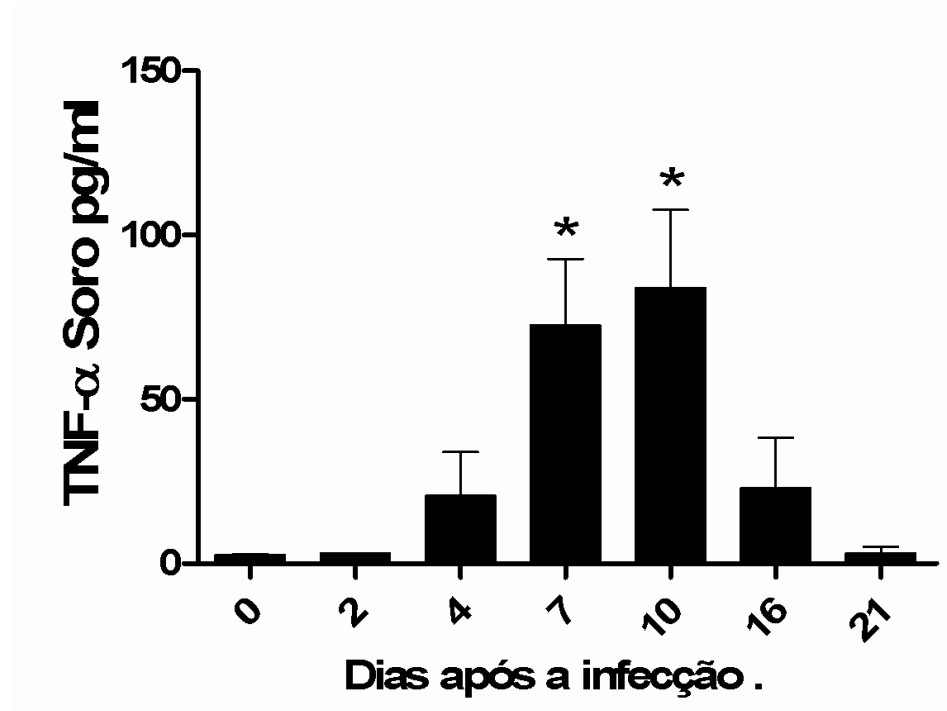


Figura 10. Produção de TNF- α em camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1. *diferença estatística significativa quando comparado com camundongos não infectados (dia 0). ($p < 0,05$). Um número de quatro animais foi sacrificado em cada dia de experimento.

Os animais infectados apresentaram um aumento significativo da produção de IFN γ entre os dias 4 e 16, com um pico entre os dias 7 e 10 após infecção.

Figura 11. Produção de IFN- γ

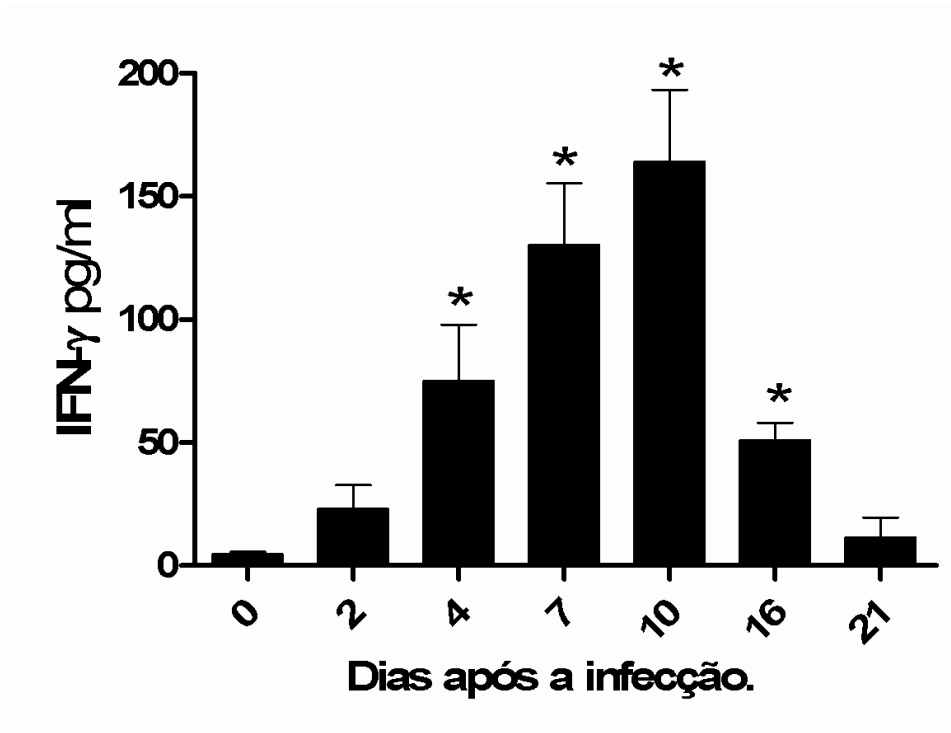


Figura 11. Produção de IFN- γ em camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1. *diferença estatística significativa quando comparado com camundongos não infectados (dia 0), ($p < 0,05$). Um número de quatro animais foi sacrificado em cada dia de experimento.

Por outro lado, não houve aumento significativo da produção de IL-10 nos camundongos infectados (Figura 12).

Figura 12. Produção de IL-10

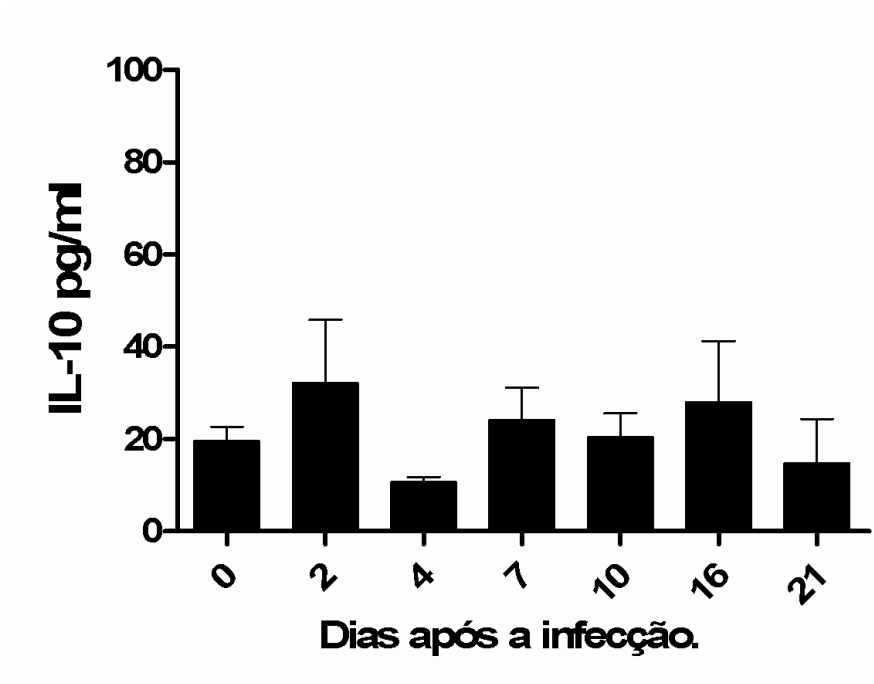


Figura 12. Produção de IL-10 em camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1. Sem variações significativas durante os dias observados. Um número de quatro animais foi sacrificado em cada dia de experimento.

O perfil de produção de citocinas, incluindo IL-17, também foi avaliado nas células do baço. Para tal os camundongos foram infectados, como mencionado anteriormente e no sétimo dia os mesmos foram sacrificados para retirada do baço. Os esplenócitos foram estimulados com PMA *in vitro* e as citocinas intracelulares foram quantificadas. A Figura 13 mostra que não houve aumento na produção de linfócitos nos camundongos infectados quando comparados com os animais não infectados, mas que as citocinas IL-10, TNF- α e IFN- γ produzidas por células CD4⁺ encontravam-se

significativamente aumentadas nos camundongos infectados, enquanto que os níveis de IL-17 não se alteraram (Figura 13 e 14).

Figura 13. Gráfico de Produção de citocinas intracelulares

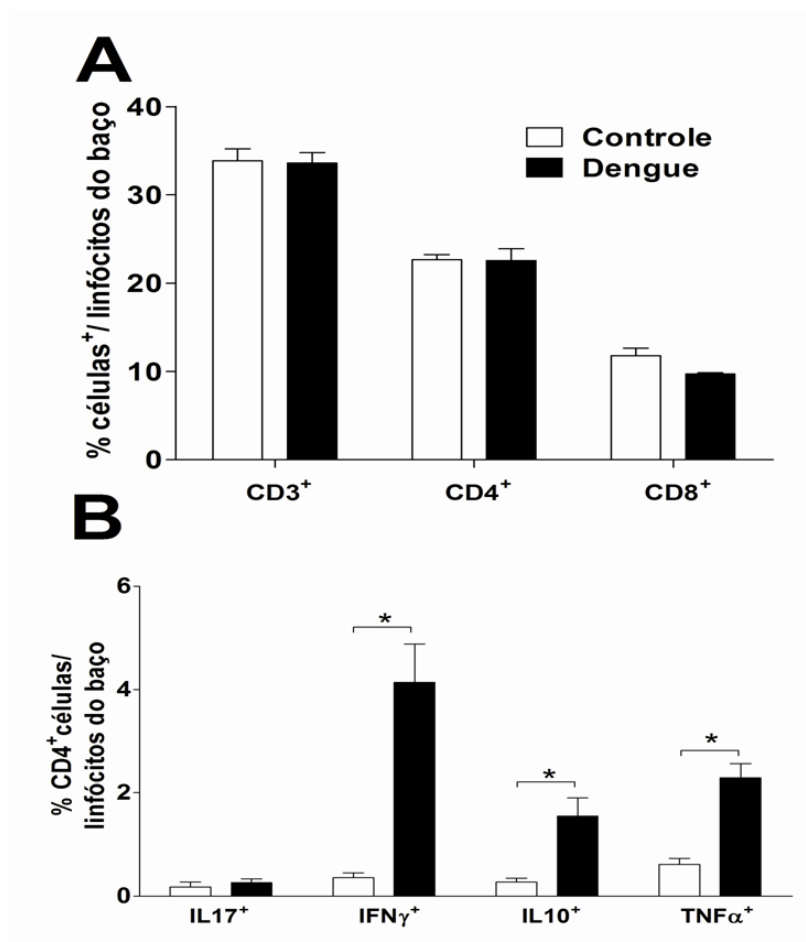


Figura 13. Camundongos infectados com DENV-1 e sacrificados no sétimo dia após infecção para avaliação da produção de linfócitos (A) e citocinas intracelulares (B). * Diferença significativa quando comparado com os animais não infectados. Um número de oito animais foi utilizado no experimento.

Figura 14. Produção de citocinas intracelulares

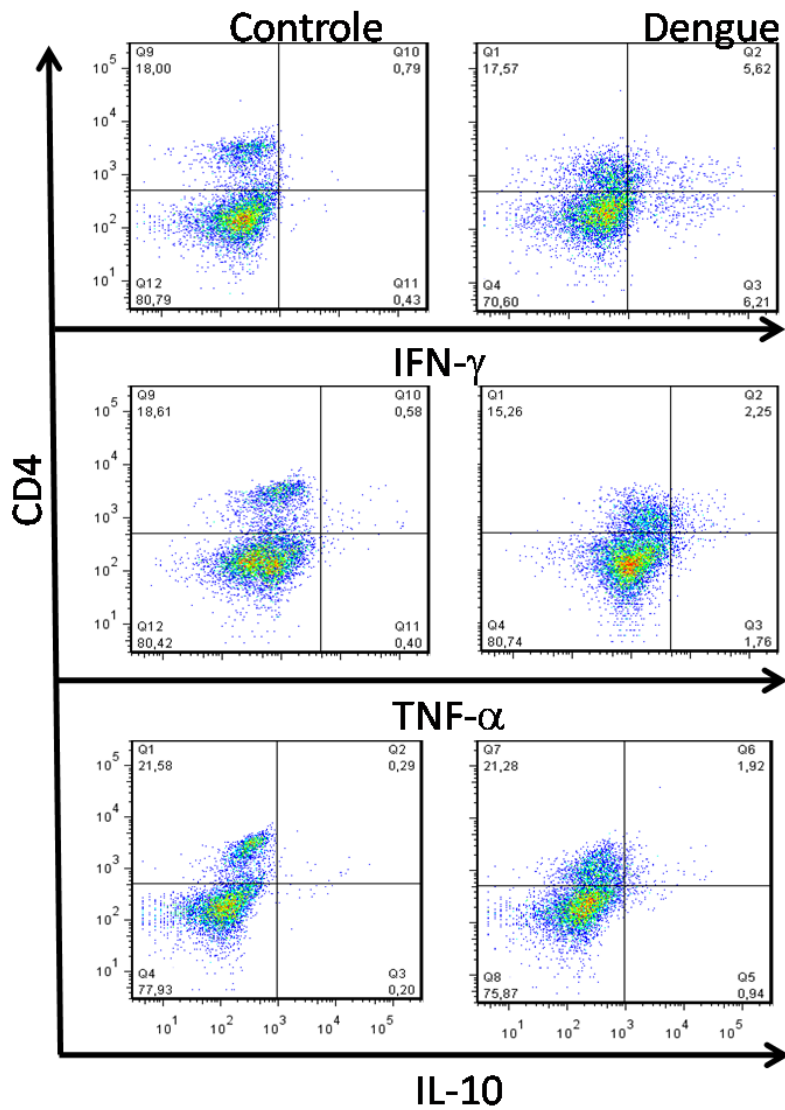


Figura 14. Produção de citocinas intracelulares em linfócitos CD4⁺ obtidos de camundongos infectados com DENV-1 sete dias após infecção.

Para uma melhor análise da participação de IFN- γ na patogênese da dengue, camundongos deficientes (nocaute) de esta citocina foram infectados nas mesmas condições que os animais selvagens, como mencionado anteriormente. Primeiramente analisamos a capacidade do DENV-1 de infectar os camundongos nocautes. Para tal, a carga viral no soro de quatro animais foi determinada por RT-PCR em tempo real 2, 4, 7, 10, 16 e 21 dias após infecção (Figura 15). Os animais nocautes apresentaram uma carga viral significativamente maior que os animais selvagens, com pico de infecção entre os sétimo e décimo dias.

Figura 15. Cinética de viremia no soro dos animais C57BL/6 e deficientes de IFN γ .

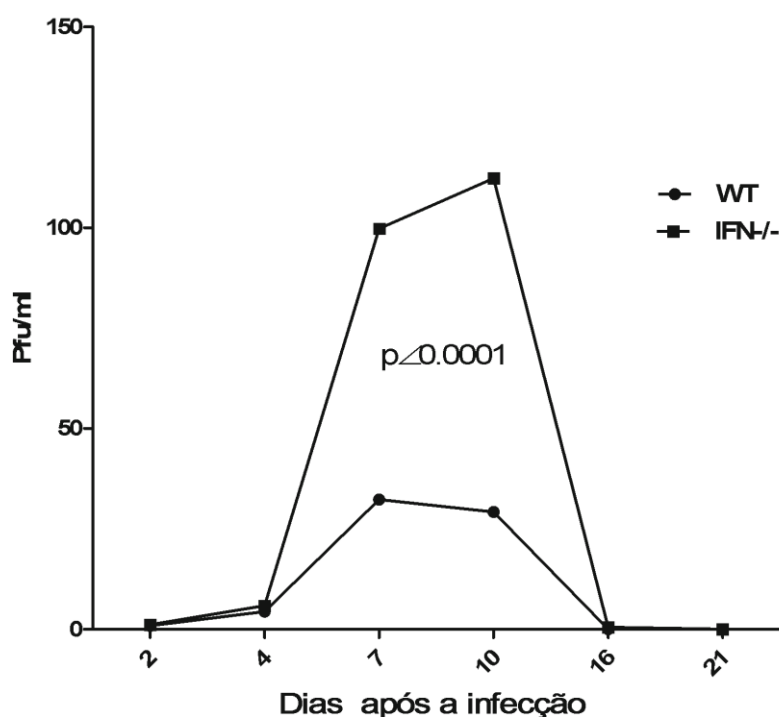


Figura 15. Carga viral determinada por RT-PCR em tempo real no soro de camundongos C57BL/6 e deficientes de IFN- γ . Um número de quatro animais foi utilizado em cada dia de experimento.

Posteriormente, quatro camundongos foram sacrificados no sétimo dia de infecção para análise das citocinas no soro (Figura 16). Outros 10 animais foram acompanhados até o vigésimo primeiro dia de infecção para análise da sobrevivência (Figura 17).

Figura 16. Comparação da produção e citocinas no sétimo dia de infecção

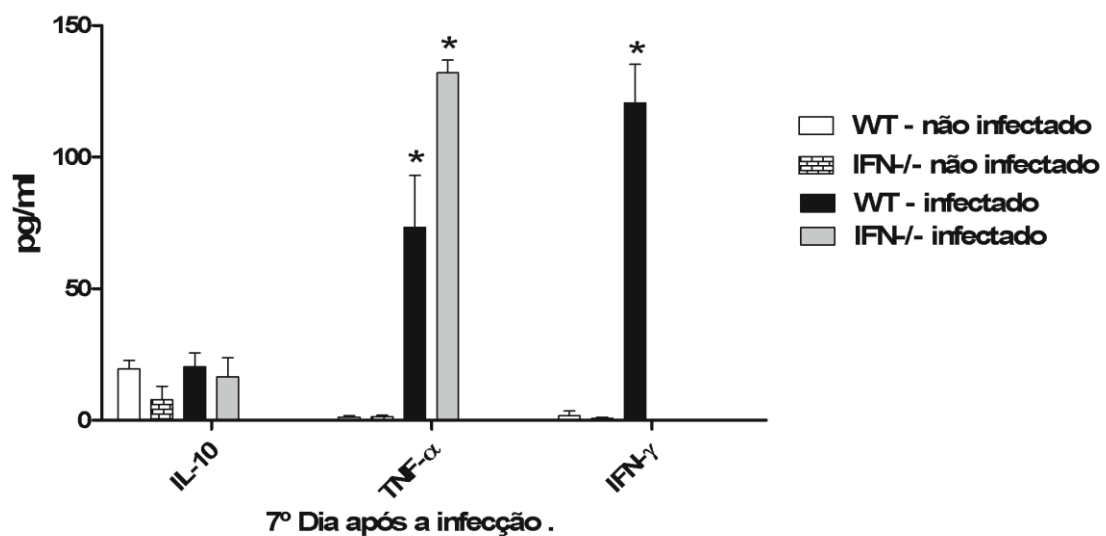


Figura 16. Produção de citocinas avaliada no soro de camundongos selvagens e nocaute para IFN- γ sete dias após infecção com DENV-1. Um número de quatro animais foi sacrificado em cada experimento.

Na análise de sobrevivência, de 22 animais selvagens infectados, 2 (9%) foram a óbito; enquanto que de 10 camundongos nocaute para IFN- γ infectados, 4 (40%) foram a óbito. Esta diferença foi significativa sugerindo que o IFN- γ possui importante participação no controle da infecção pelo vírus da dengue.

Figura 17. Curva de sobrevivência



Figura 17. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens (n= 22) e nocaute para IFN- γ (n= 10) infectados com DENV-1. O gráfico acima mostra que cerca de 40% dos animais IFN-/- sucumbiram a infecção.

5.3 Histopatologia do fígado dos camundongos

Para análise histológica do fígado e cérebro, camundongos selvagens foram infectados como mencionado anteriormente e sacrificados nos dias 2, 4, 7, 10, 16, 21 após infecção para coleta de fígado e cérebro. Análise das lâminas mostrou que os camundongos selvagens apresentaram infiltrados celulares no fígado no sétimo e décimo dias (Figura 18) e aumento significativo na contagem de núcleos no décimo dia (Figura 19).

Figura 18. Histologia do fígado dos camundongos C57BL/6

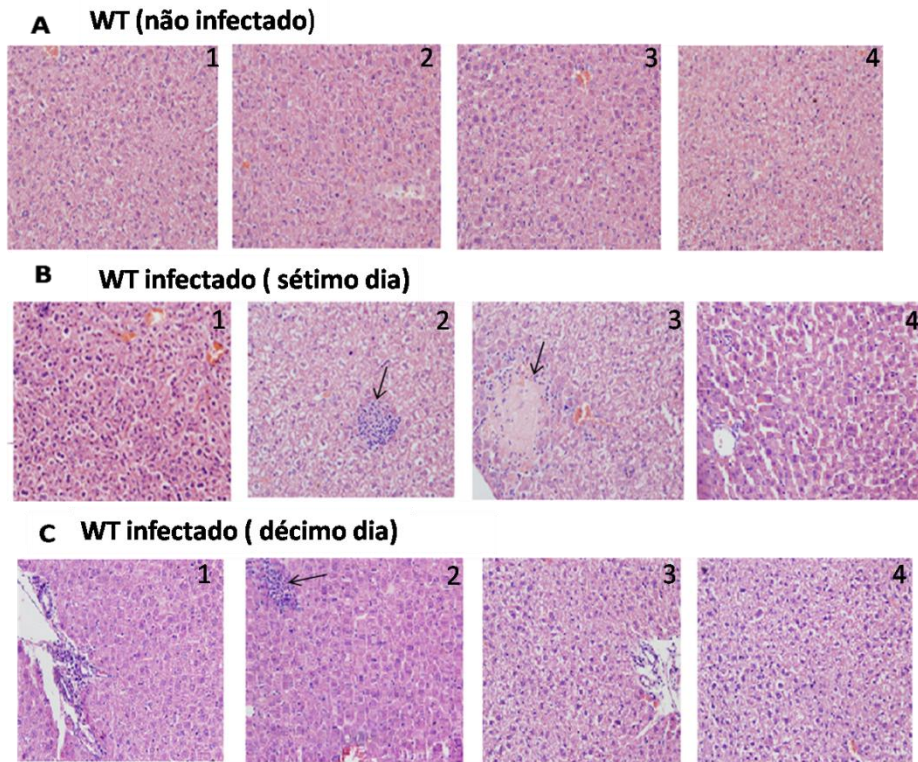


Figura 18. Histologia do fígado dos camundongos C57BL/6 não infectados (A) e infectados (B e C). Como exemplos são mostrados diferentes campos fotografados de quatro animais diferentes (1-4). As setas indicam presença de infiltrado celular. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina. Aumento de 400 vezes.

Figura 19. Contagem de núcleos

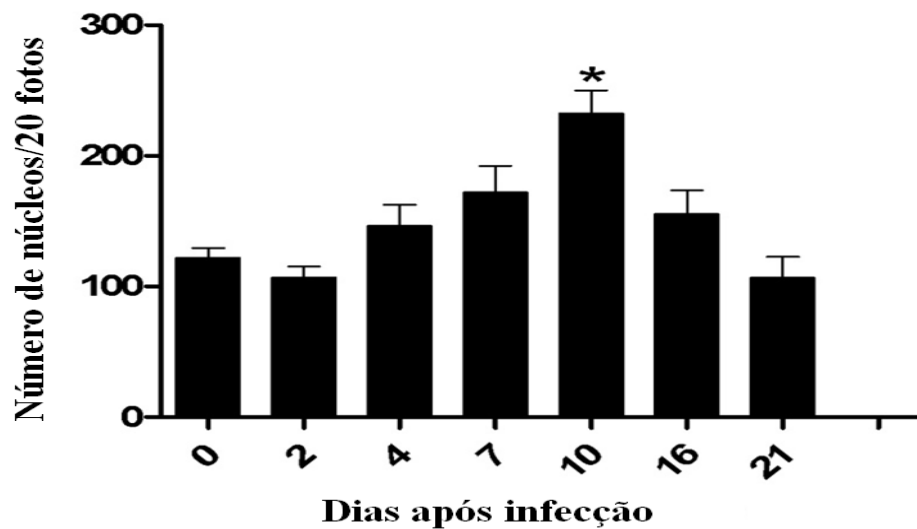


Figura 19. Contagem de núcleos nas lâminas de fígado dos camundongos WT infectados com DENV-1. Um número de quatro animais foi utilizado em cada dia de experimento.

O dano hepático também foi analisado nos camundongos nocaute para IFN- γ sete dias após a infecção com DENV-1. Os camundongos infectados apresentaram um grande infiltrado celular (Figura 20). Adicionalmente, o fígado dos camundongos infectados apresentaram uma contagem de núcleos significativamente maior quando comparados com os animais nocaute não infectados e com os selvagens infectados (Figura 21).

Figura 20. Histologia do fígado dos camundongos nocaute para IFN- γ

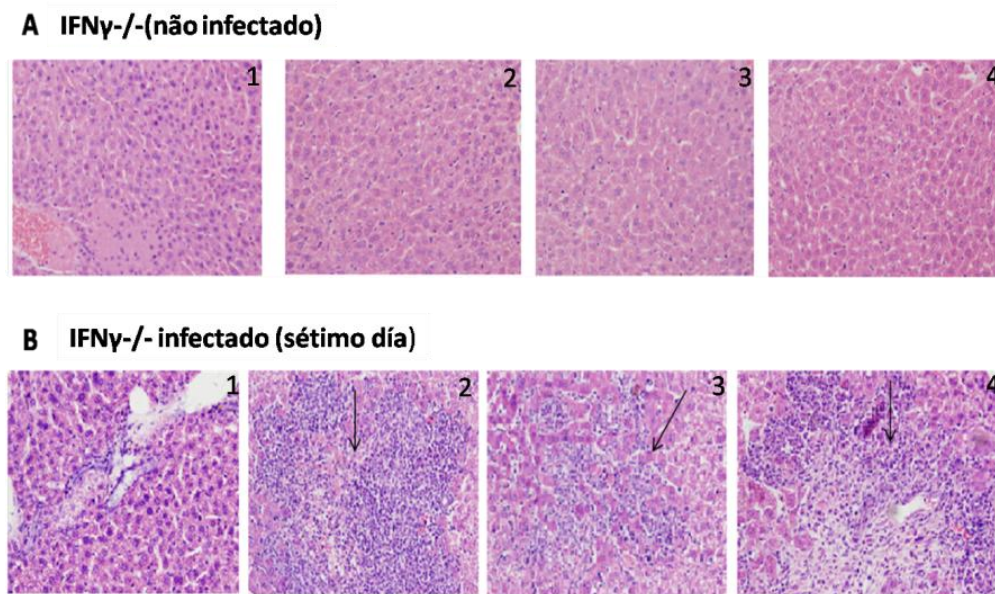


Figura 20. Histologia do fígado dos camundongos nocaute para IFN- γ não infectados (A) e infectados (B). Como exemplo, são mostrados diferentes campos fotografados de quatro animais diferentes (1-4). As setas indicam presença de infiltrado celular. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina. Aumento de 400 vezes.

Figura 21. Contagem de núcleos nas lâminas de fígado dos camundongos selvagem e nocautes infectados ou não com DENV-1

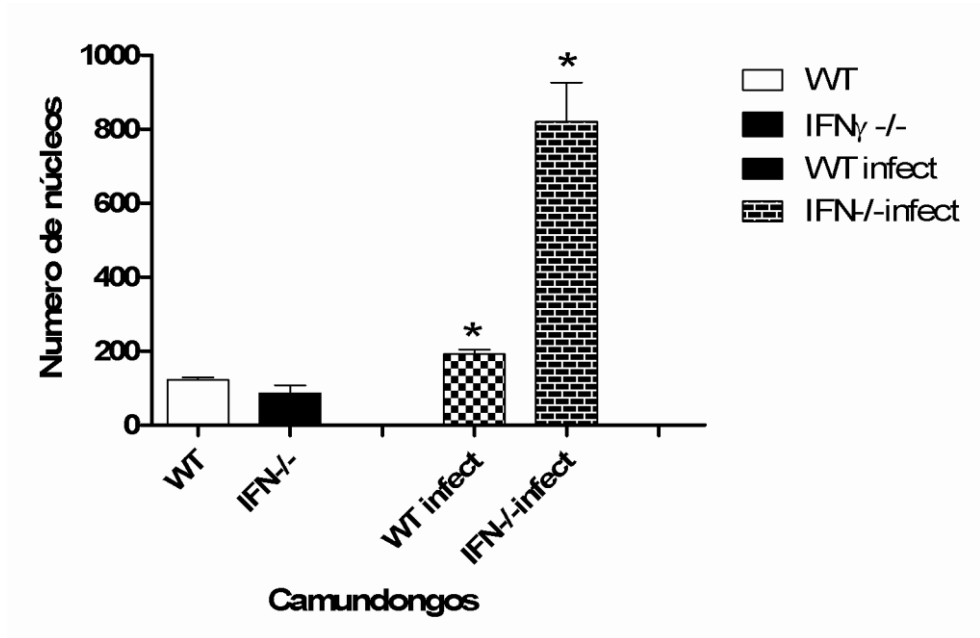


Figura 21. Media de 20 fotos da contagem de núcleos nas lâminas de fígado dos camundongos selvagem e nocautes infectados ou não com DENV-1. O fígado dos camundongos infectados foi analisado no sétimo dia apos infecção. As barras indicadas com asterisco indicam um aumento estatisticamente significativo. Um número de quatro animais foi utilizado em cada dia de experimento.

5.3.1 Histopatologia do cérebro dos camundongos

Análise das lâminas de cérebro dos camundongos infectados com DENV-1 mostrou que não houve infiltrado celular nem aumento do número de núcleos (Figura 17-20).

Figura 22. Histologia de cérebro dos camundongos C57BL/6

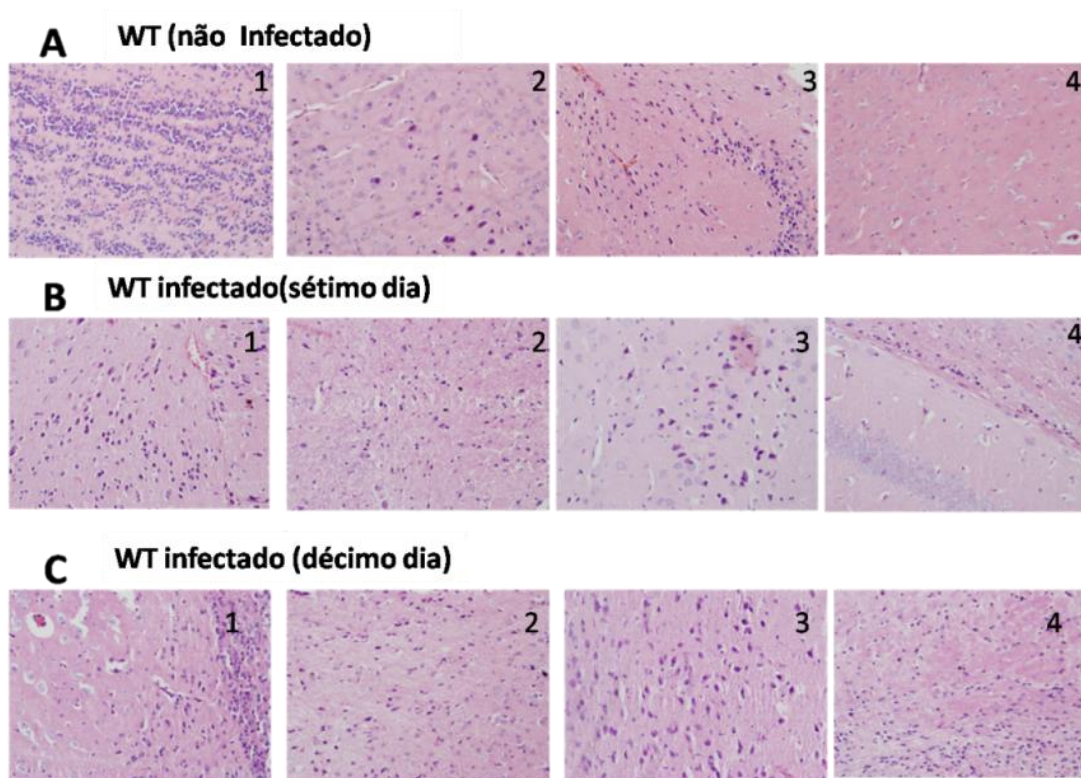


Figura 22. Histologia de cérebro dos camundongos C57BL/6 não infectados (A) e infectados (B e C). Como exemplo, são mostrados diferentes campos fotografados de quatro animais diferentes (1-4). Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina. Aumento de 400 vezes.

Figura 23. Contagem de núcleos nas lâminas de cérebro dos camundongos C57BL/6

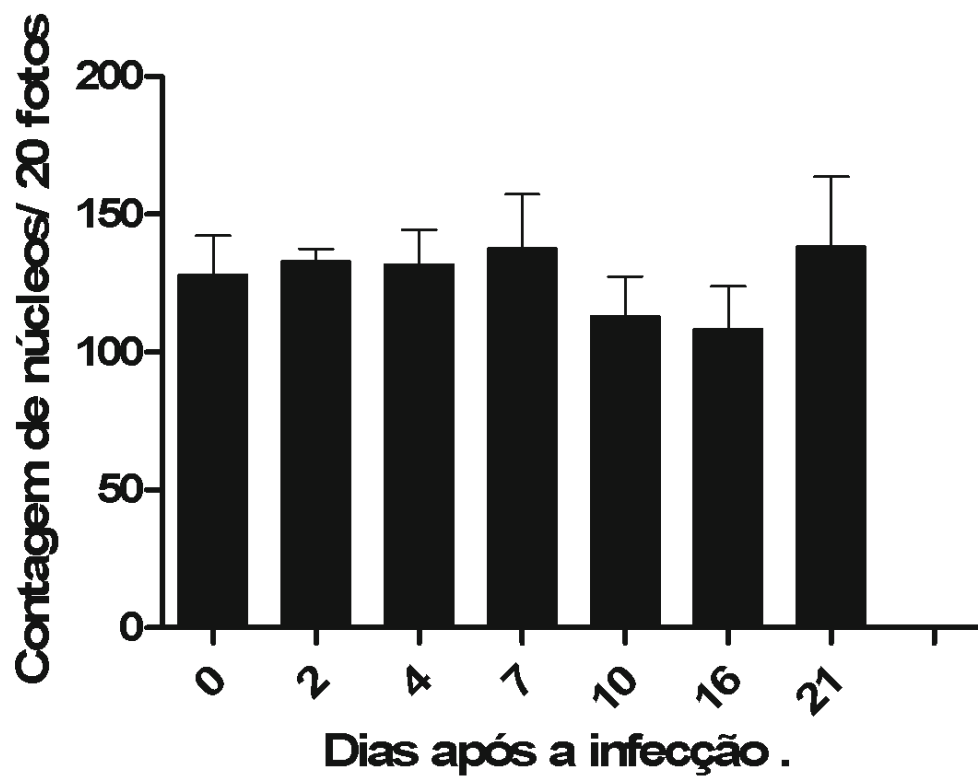
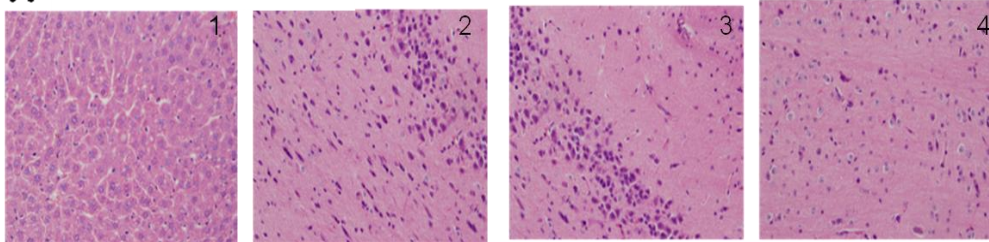


Figura 23. Contagem de núcleos nas lâminas de cérebro dos camundongos C57BL/6 infectados com DENV-1, mostrando que não houve alteração estatisticamente significativa ao longo dos dias observados após a infecção. Um número de quatro animais foi utilizado em cada dia de experimento.

Figura 24. Histologia de cérebro dos camundongos nocaute para IFN- γ

A IFN-/- não infectado



B IFN-/- infectado (sétimo dia)

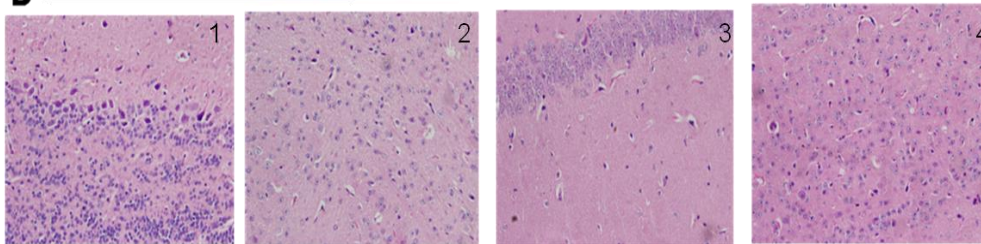


Figura 24. Histologia de cérebro dos camundongos nocaute para IFN- γ não infectados (A) e infectados (B). Como exemplo, são mostrados diferentes campos fotografados de quatro animais diferentes (1-4). Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina. Aumento de 400 vezes.

Os camundongos nocaute para IFN- γ não apresentaram infiltrado celular quando visualizada a lâmina histológica e a contagem de núcleos mostrou que os camundongos infectados não apresentaram um número maior de células no cérebro (Figura 24 e 25).

Figura 25. Contagem de núcleos nas lâminas de cérebro dos camundongos selvagem e nocautes em IFN- γ no sétimo dia após infecção

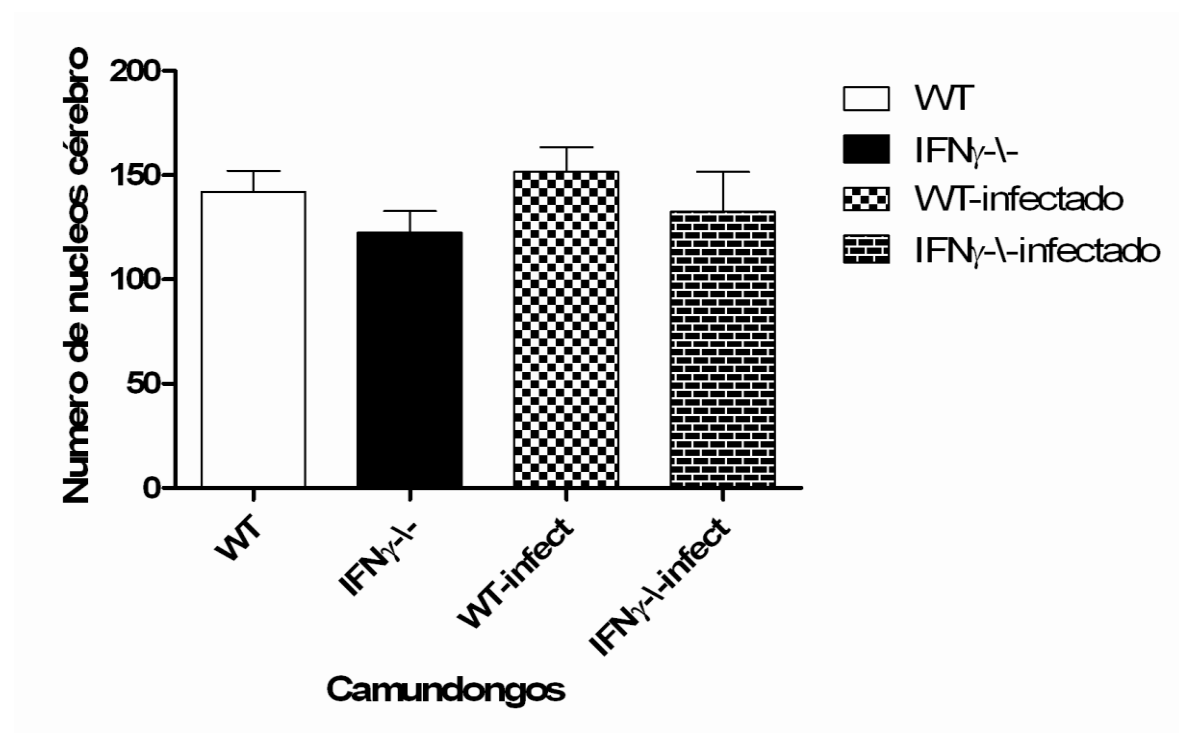


Figura 25. Media de 20 fotos da contagem de núcleos nas lâminas de cérebro dos camundongos selvagem e nocautes em IFN- γ infectados ou não com DENV-1. O cérebro dos camundongos infectados foi analisado no sétimo dia após infecção. Um número de quatro animais foi utilizado em cada dia de experimento.

6. Discussão

Neste trabalho analisamos os camundongos C57BL/6 como modelo para estudo da infecção pelo vírus da dengue. Embora os animais não apresentaram doença totalmente similar à observada em humanos, mostraram ser suscetíveis à infecção pelo DENV-1 e algumas características e sintomas que lembram a doença humana, como por exemplo aumento do Hematócrito, plaquetopenia, aumento da produção de TNF- α , IFN- γ e IL-10. (KITIGUL et al., 2007; FRIED et al., 2010; RIGAU-PÉREZ, 1997)

A maioria dos isolados de dengue não replicam bem em camundongos imunocompetentes. Entretanto, alguns autores utilizaram animais imunocompetentes e mostraram que estes são suscetíveis à infecção pelo vírus da dengue (CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2004; PAES et al., 2005, ATRASHEUSKAYA et al., 2003; SACHES-BURGOS et al., 2004). O modelo utilizado em nosso estudo mostrou também ser suscetível à infecção pelo DENV-1 adaptado em cérebro de camundongo. Os camundongos apresentaram viremia detectável do segundo até o décimo sexto dia de infecção (Figura 7), sendo que o vírus atingiu sua taxa viral máxima no cérebro no décimo dia de infecção (Figura 8) o que é característico de uma cepa viral adaptada em cérebro de camundongos. Adicionalmente, o vírus foi detectado em fígado, baço, rim e cérebro. Estes achados são similares aos observados também em camundongos por outros autores (CHEN et al., 2004; CHEN et al., 2007; PAES, et al., 2005, ATRASHEUSKAYA et al., 2003).

Uma das características da infecção pelo vírus da dengue em humanos é a plaquetopenia. A depressão da medula óssea, bem como o consumo e o sequestro de plaquetas induzidos pela infecção por DENV poderiam estar relacionados com a trombocitopenia apresentada pelos pacientes (La Russa and Innis 1995). A destruição plaquetária seria mediada por auto-anticorpos anti-plaquetas (Lin et al. 2001) ou pela formação de imunocomplexos na superfície das plaquetas, por ligação direta do vírus

às mesmas. Assim as plaquetas seriam eliminadas por macrófagos e/ou pela ativação do complemento (Oishi et al. 2003, Wang et al. 1995, Saito et al. 2004). A plaquetopenia foi também observada por Souza et al. (2009) utilizando como modelo animal BALB/c imunocompetentes infectados com DENV-2 e por Chen et al. (2007) utilizando C57BL/6 infectado com DENV-2. Nosso modelo animal também mostrou plaquetopenia entre o sétimo e décimo dias (Figura 9).

Nos últimos anos, manifestações atípicas de dengue têm sido descritas em humanos, incluindo dano hepático além de envolvimento do sistema nervoso central e alterações cardíacas, as quais foram observadas durante epidemias no Brasil (SOUZA et al, 1995; VASCONCELOS et al., 1994, NOGUEIRA et al., 2002; SOUZA et al., 2004). Modelos animais também apresentam dano hepático (CHEN et al., 2007, PAES, et al., 2005, ATRASHEUSKAYA et al, 2003). O modelo animal descrito neste trabalho mostrou presença de infiltrado celular inflamatório no fígado, sugerindo um dano hepático (Figura 18), pois a análise das lâminas mostrou que os camundongos selvagens apresentaram infiltrados celulares no fígado no sétimo e décimo dias (Figura 18) e aumento significativo na contagem de núcleos no décimo dia (Figura 19).

O dano hepático também foi analisado nos camundongos nocaute para $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ sete dias após a infecção com DENV-1. Os camundongos $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ infectados apresentaram um grande infiltrado celular no sétimo dia de infecção (Figura 20) o que provavelmente foi a causa da morte de quatro dos dez animais utilizados no experimento, adicionalmente, o fígado dos camundongos infectados apresentaram uma contagem de núcleos significativamente maior quando comparados com os animais nocaute não infectados e com os selvagens infectados (Figura 21) mostrando que como modelo de comparação os animais $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ foram mais prejudicados pelo vírus.

Adicionalmente, nosso modelo mostrou presença de vírus no cérebro, fato

observado também por outros autores (SACHES-BURGOS et al., 2004, CHEN et al., 2007), porém sem desenvolvimento de sinais clássicos de encefalite descritos por : (AN et al., 1999; DESPRÈS et al., 1998.). Este dado é similar a aquele descrito por Tan et al. (2010) que tampouco observaram sinais de encefalite em camundongos deficientes de $\text{IFN}\alpha/\beta$ e $\text{IFN-}\gamma$, apesar da presença do vírus no órgão , Análise das lâminas de cérebro dos camundongos WT infectados com DENV-1 mostrou que não houve infiltrado celular nem aumento do número de núcleos (Figura 22) , assim como os camundongos nocaute para $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ não apresentaram infiltrado celular quando visualizada a lâmina histológica, nem aumento na contagem de núcleos (Figura 23).

Estudos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais sugerem que os componentes imunoprotetores contra a infecção pelo vírus da dengue incluem anticorpo (FALGOUT et al., 1990; GENTRY et al., 1982; KURANE et al., 1986), células T (KURANE et al., 1989; MATHEW et al., 1996), além de IFNs (DIAMOND & HARRIS, 2001; DIAMOND et al., 2000; SHRESTA et al., 2004). Porém a resposta imune mediada por $\text{IFN-}\gamma$ é crucial para resolução da infecção pelo vírus da dengue (SHRESTA et al., 2004). O modelo descrito em nosso estudo mostra também a importância do $\text{IFN-}\gamma$ no controle da infecção viral, pois os camundongos selvagens apresentaram menor viremia em relação aos animais controles $\text{IFN}\gamma^{-/-}$, como também um aumento na produção de $\text{IFN-}\gamma$ no soro entre o quarto e o décimo sexto dias após infecção (Figura 11), leve infiltrado de células inflamatórias no fígado, sendo que 91,8% dos camundongos sobreviveram à infecção. Enquanto que os camundongos deficientes de $\text{IFN-}\gamma$ apresentaram maior viremia, grande quantidade de infiltrado inflamatório no fígado (e uma letalidade de 40% (Figura 17).

A resposta imune envolvendo ativação de célula T, produção de citocinas e quimiocinas, e ativação de complemento são considerados importantes para a

patogênese da dengue hemorrágica (Green et al, 1999; Malasit, 1987; Rothman & Ennis, 1999). Além disso altos níveis de $\text{TNF}\alpha$ estão associados com as formas graves da doença (Bethell et al., 1998; Green et al, 1999). Trabalhos com modelo animal mostraram também a importância do $\text{TNF-}\alpha$ na patogênese da doença (ATRASHCHENKO et al, 2003; CHEN et al., 2007). Os dados apresentados em nosso estudo mostram que os camundongos deficientes em $\text{IFN-}\gamma$ apresentaram aumento significativo na produção de $\text{TNF-}\alpha$ quando comparados com os animais selvagens (Figura 10) e este aumento poderia estar relacionado com o aumento na percentagem de óbitos.

7. Conclusões finais.

1. Os animais C57BL/6 selvagens infectados com o DENV-1 mochiisuki apresentaram carga viral detectável até o décimo sexto dia, o vírus teve um tropismo maior para o cérebro, mas não causou quadros de encefalite em nenhum dos modelos animais estudados;
2. O animal C57BL/6 selvagem pode ser usado como modelo experimental para infecção com DENV.
3. O animal C57BL/6 selvagem apresentou algumas alterações nas análises hematológicas e nos padrões de citocinas semelhantes as alterações humanas causadas pela infecção com o DENV como aumento da produção de IFN- γ e plaquetopenia

Referencias

- ALTSCHUL, S. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 25, n. 17, p. 3389-402, Sep 1997a.
- ALVAREZ, D. *et al.* Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology* [S.I.], v. 375, n. 1, p. 223-35, May 2008.
- AN, J. *et al.* Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology* [S.I.], v. 263, n. 1, p. 70-7, Oct 1999.
- AQUINO, V. *et al.* Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 75, n. 4, p. 710-5, Oct 2006.
- AQUINO, V. *et al.* Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 75, n. 4, p. 710-5, Oct 2006.
- ARAÚJO, J. *et al.* Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [S.I.], v. 104, n. 3, p. 526-9, May 2009.
- ATRASHEUSKAYA, A. *et al.* Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* [S.I.], v. 35, n. 1, p. 33-42, Jan 2003.
- AZEREDO, E. *et al.* Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* [S.I.], v. 204, n. 4, p. 494-507, Dec 2001.
- BARCELOS FIGUEIREDO, L. *et al.* Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 14, n. 2, p. 314-6, Feb 2008a.
- BETHELL, D. *et al.* Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* [S.I.], v. 177, n. 3, p. 778-82, Mar 1998.
- BLACKLEY, S. *et al.* Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus infection in vitro. *J Virol* [S.I.], v. 81, n. 24, p. 13325-34, Dec 2007.
- BLANEY, J. J. *et al.* Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. *BMC Infect Dis* [S.I.], v. 4, p. 39, Oct 2004.

BLOK, J. *et al.* Comparison of dengue viruses and some other flaviviruses by cDNA-RNA hybridization analysis and detection of a close relationship between dengue virus serotype 2 and Edge Hill virus. *J Gen Virol* [S.I.], v. 65 (Pt 12), p. 2173-81, Dec 1984.

BLOK, J. Genetic relationships of the dengue virus serotypes. *J Gen Virol* [S.I.], v. 66 (Pt 6), p. 1323-5, Jun 1985.

BUNDO, K.; IGARASHI, A. Antibody-capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. *J Virol Methods* [S.I.], v. 11, n. 1, p. 15-22, May 1985.

BURKE, D. *et al.* A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 38, n. 1, p. 172-80, Jan 1988a.

BUTT, N. *et al.* Haematological and biochemical indicators for the early diagnosis of dengue viral infection. *J Coll Physicians Surg Pak* [S.I.], v. 18, n. 5, p. 282-5, May 2008.

CALLAHAN, J. *et al.* Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J Clin Microbiol* [S.I.], v. 39, n. 11, p. 4119-24, Nov 2001.

CARDIER, J. *et al.* Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine* [S.I.], v. 30, n. 6, p. 359-65, Jun 2005.

CHAKRAVARTI, A.; KUMARIA, R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res* [S.I.], v. 123, n. 1, p. 25-30, Jan 2006.

CHAMBERS, T. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* [S.I.], v. 44, p. 649-88, 1990.

CHEN, H. *et al.* Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol* [S.I.], v. 81, n. 11, p. 5518-26, Jun 2007.

CHEN, H. *et al.* Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J Med Virol* [S.I.], v. 73, n. 3, p. 419-31, Jul 2004a.

CHIU, W. *et al.* Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *J Virol* [S.I.], v. 79, n. 13, p. 8303-15, Jul 2005.

CHONGSRISAWAT, V. *et al.* Liver function test results and outcomes in children with acute liver failure due to dengue infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* [S.I.], v. 40, n. 1, p. 47-53, Jan 2009.

CHUNGUE, E. *et al.* [Significance of IgM titration by an immunoenzyme technic for the serodiagnosis and epidemiological surveillance of dengue in French Polynesia]. *Res*

Virol [S.I.], v. 140, n. 3, p. 229-40, 1989 May-Jun 1989.

CHUTINIMITKUL, S. *et al.* Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. *J Virol Methods* [S.I.], v. 129, n. 1, p. 8-15, Oct 2005.

COLOGNA, R.; RICO-HESSE, R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* [S.I.], v. 77, n. 7, p. 3929-38, Apr 2003.

DE MORAIS BRONZONI, R. *et al.* Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol* [S.I.], v. 43, n. 2, p. 696-702, Feb 2005.

DESPRÈS, P. *et al.* Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. *J Virol* [S.I.], v. 72, n. 1, p. 823-9, Jan 1998.

DEUBEL, V. *et al.* Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J Virol Methods* [S.I.], v. 30, n. 1, p. 41-54, Oct 1990.

DIAMOND, M. *et al.* Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol* [S.I.], v. 74, n. 17, p. 7814-23, Sep 2000.

DIAMOND, M. *et al.* Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol* [S.I.], v. 74, n. 11, p. 4957-66, Jun 2000.

DIAMOND, M.; HARRIS, E. Interferon inhibits dengue virus infection by preventing translation of viral RNA through a PKR-independent mechanism. *Virology* [S.I.], v. 289, n. 2, p. 297-311, Oct 2001.

DOS SANTOS, H. *et al.* A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *J Med Virol* [S.I.], v. 80, n. 8, p. 1426-33, Aug 2008a.

DOS SANTOS, H. *et al.* A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *J Med Virol* [S.I.], v. 80, n. 8, p. 1426-33, Aug 2008a.

DROSTEN, C. *et al.* Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* [S.I.], v. 40, n. 7, p. 2323-30, Jul 2002.

FIGUEIREDO, L. *et al.* Dengue serologic survey of schoolchildren in Rio de Janeiro, Brazil, in 1986 and 1987. *Bull Pan Am Health Organ* [S.I.], v. 24, n. 2, p. 217-25, 1990.

FIGUEIREDO, R. *et al.* Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 14, n. 4, p. 667-9, Apr 2008.

FOSTER, J. *et al.* Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. *Virology* [S.I.], v. 306, n. 1, p. 126-34, Feb 2003.

FRIED, J. *et al.* Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis* [S.I.], v. 4, n. 3, p. e617, 2010.

GONCALVEZ, A. *et al.* Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology* [S.I.], v. 303, n. 1, p. 110-9, Nov 2002.

GOULD, E.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* [S.I.], v. 371, n. 9611, p. 500-9, Feb 2008.

GRITSUN, T. *et al.* Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs. *Virus Res* [S.I.], v. 49, n. 1, p. 27-39, May 1997.

GRITSUN, T.; GOULD, E. Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. *J Virol Methods* [S.I.], v. 76, n. 1-2, p. 109-20, Dec 1998.

GRITSUN, T.; GOULD, E. Infectious transcripts of tick-borne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR. *Virology* [S.I.], v. 214, n. 2, p. 611-8, Dec 1995.

GUALANO, R. *et al.* Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. *J Gen Virol* [S.I.], v. 79 (Pt 3), p. 437-46, Mar 1998.

GUBLER, D. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 100-3, Feb 2002.

GURUKUMAR, K. *et al.* Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J* [S.I.], v. 6, p. 10, 2009.

HALSTEAD, S. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med* [S.I.], v. 42, n. 5, p. 350-62, Apr 1970.

HALSTEAD, S. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* [S.I.], v. 239, n. 4839, p. 476-81, Jan 1988.

HALSTEAD, S. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* [S.I.], v. 239, n. 4839, p. 476-81, Jan 1988a.

HO, L. *et al.* Dengue virus type 2 antagonizes IFN- α but not IFN- γ antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol* [S.I.], v. 174, n. 12, p. 8163-72, Jun 2005a.

HO, L. *et al.* Infection of human dendritic cells by dengue virus activates and primes T cells towards Th0-like phenotype producing both Th1 and Th2 cytokines. *Immunol Invest* [S.I.], v. 33, n. 4, p. 423-37, 2004.

HOLMES, E.; TWIDDY, S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue

virus. *Infect Genet Evol* [S.I.], v. 3, n. 1, p. 19-28, May 2003.

HOLMES, E.; TWIDDY, S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* [S.I.], v. 3, n. 1, p. 19-28, May 2003.

HOUNG, H. *et al.* Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3' noncoding sequences. *J Virol Methods* [S.I.], v. 95, n. 1-2, p. 19-32, Jun 2001.

HOUNG, H. *et al.* Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3' noncoding sequences. *J Virol Methods* [S.I.], v. 95, n. 1-2, p. 19-32, Jun 2001.

HUMAYOUN, M. *et al.* Multiple dengue serotypes and high frequency of dengue hemorrhagic fever at two tertiary care hospitals in Lahore during the 2008 dengue virus outbreak in Punjab, Pakistan. *Int J Infect Dis* [S.I.], Feb 2010.

INNIS, B. *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 40, n. 4, p. 418-27, Apr 1989.

JAIN, A.; CHATURVEDI, U. Dengue in infants: an overview. *FEMS Immunol Med Microbiol* [S.I.], Mar 2010.

JAIYEN, Y. *et al.* Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol* [S.I.], v. 53, n. 8, p. 442-50, Aug 2009.

JENNINGS, A. *et al.* Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine-associated human encephalitis. *J Infect Dis* [S.I.], v. 169, n. 3, p. 512-8, Mar 1994.

KABRA, S. *et al.* Dengue hemorrhagic fever: clinical manifestations and management. *Indian J Pediatr* [S.I.], v. 66, n. 1, p. 93-101, 1999 Jan-Feb 1999.

KAPOOR, M. *et al.* Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). *Gene* [S.I.], v. 162, n. 2, p. 175-80, Sep 1995.

KAWANO, H. *et al.* Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice. *J Virol* [S.I.], v. 67, n. 11, p. 6567-75, Nov 1993.

]

KERSCHNER, J. *et al.* Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 viruses by hybridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes. *J Gen Virol* [S.I.], v. 67 (Pt 12), p. 2645-61, Dec 1986.

KHROMYKH, A. *et al.* Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol* [S.I.], v. 75, n. 10, p. 4633-40, May 2001.

KHROMYKH, A. *et al.* trans-Complementation of flavivirus RNA polymerase gene

NS5 by using Kunjin virus replicon-expressing BHK cells. *J Virol* [S.I.], v. 72, n. 9, p. 7270-9, Sep 1998.

KHROMYKH, A.; WESTAWAY, E. Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. *J Virol* [S.I.], v. 68, n. 7, p. 4580-8, Jul 1994.

KINNEY, R. *et al.* Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* [S.I.], v. 230, n. 2, p. 300-8, Apr 1997.

KITTIGUL, L. Determination of tumor necrosis factor-alpha levels in dengue virus infected patients by sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods* [S.I.], v. 90, n. 1, p. 51-7, Oct 2000.

KITTIGUL, L. *et al.* The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. *J Clin Virol* [S.I.], v. 39, n. 2, p. 76-81, Jun 2007.

KOWALCZYKOWSKI, S. *et al.* Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* [S.I.], v. 58, n. 3, p. 401-65, Sep 1994.

KUNO, G. *et al.* Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull World Health Organ* [S.I.], v. 63, n. 2, p. 279-86, 1985.

KURANE, I. *et al.* Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. *Immunology* [S.I.], v. 58, n. 3, p. 429-36, Jul 1986.

KURANE, I. *et al.* Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gamma production. *J Clin Invest* [S.I.], v. 83, n. 2, p. 506-13, Feb 1989.

KURANE, I. *et al.* Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gamma production. *J Clin Invest* [S.I.], v. 83, n. 2, p. 506-13, Feb 1989.

KYLE, J.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* [S.I.], v. 62, p. 71-92, 2008.

LAI, C. *et al.* Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 88, n. 12, p. 5139-43, Jun 1991a.

LANCIOTTI, R. *et al.* Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* [S.I.], v. 75 (Pt 1), p. 65-75, Jan 1994.

LAVERGNE, A. *et al.* [Dengue virus infection in neotropical forest mammals: incidental hosts or potential reservoirs?]. *Med Trop (Mars)* [S.I.], v. 69, n. 4, p. 345-50, Aug 2009.

- LEITMEYER, K. *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* [S.I.], v. 73, n. 6, p. 4738-47, Jun 1999.
- LEWIS, J. *et al.* Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology* [S.I.], v. 197, n. 1, p. 216-24, Nov 1993a.
- LIN, Y. *et al.* Study of Dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. *J Virol* [S.I.], v. 72, n. 12, p. 9729-37, Dec 1998.
- MALASIT, P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* [S.I.], v. 18, n. 3, p. 316-20, Sep 1987.
- MANDL, C. *et al.* Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *J Gen Virol* [S.I.], v. 78 (Pt 5), p. 1049-57, May 1997a.
- MANGADA, M. *et al.* Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis* [S.I.], v. 185, n. 12, p. 1697-703, Jun 2002.
- MARKOFF, L. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res* [S.I.], v. 59, p. 177-228, 2003.
- MATHENGE, E. *et al.* Fusion PCR generated Japanese encephalitis virus/dengue 4 virus chimera exhibits lack of neuroinvasiveness, attenuated neurovirulence, and a dual-flavi immune response in mice. *J Gen Virol* [S.I.], v. 85, n. Pt 9, p. 2503-13, Sep 2004.
- MATHEW, A. *et al.* Dominant recognition by human CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. *J Clin Invest* [S.I.], v. 98, n. 7, p. 1684-91, Oct 1996.
- MATHEW, A. *et al.* Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. *J Virol* [S.I.], v. 72, n. 5, p. 3999-4004, May 1998.
- MAZZON, M. *et al.* Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J Infect Dis* [S.I.], v. 200, n. 8, p. 1261-70, Oct 2009.
- MEGRET, F. *et al.* Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology* [S.I.], v. 187, n. 2, p. 480-91, Apr 1992.
- MESSER, W. *et al.* Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 9, n. 7, p. 800-9, Jul 2003a.
- MIAGOSTOVICH, M. *et al.* Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [S.I.], v. 101, n. 3, p. 307-13, May 2006.

MIAGOSTOVICH, M. *et al.* Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 35, n. 8, p. 869-72, Aug 2002.

MODIS, Y. *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* [S.I.], v. 427, n. 6972, p. 313-9, Jan 2004.

MODIS, Y. *et al.* Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol* [S.I.], v. 79, n. 2, p. 1223-31, Jan 2005.

MONATH, T. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 91, n. 7, p. 2395-400, Mar 1994.

MONATH, T. *et al.* Geographic classification of dengue-2 virus strains by antigen signature analysis. *Virology* [S.I.], v. 154, n. 2, p. 313-24, Oct 1986.

MUÑOZ-JORDÁN, J. Subversion of interferon by dengue virus. *Curr Top Microbiol Immunol* [S.I.], v. 338, p. 35-44, 2010.

NOGUEIRA, R. *et al.* Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Virol* [S.I.], v. 143, n. 6, p. 423-7, 1992 Nov-Dec 1992.

OLIVEIRA, E. *et al.* [Hematological abnormalities in patients with dengue]. *Rev Soc Bras Med Trop* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 682-5, Dec 2009.

PARKASH, O. *et al.* Severity of acute hepatitis and its outcome in patients with dengue fever in a tertiary care hospital Karachi, Pakistan (South Asia):. *BMC Gastroenterol* [S.I.], v. 10, n. 1, p. 43, May 2010a.

PEYREFITTE, C. *et al.* Dengue type 3 virus, Saint Martin, 2003-2004. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 11, n. 5, p. 757-61, May 2005.

PEYREFITTE, C. *et al.* Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies). *J Clin Microbiol* [S.I.], v. 41, n. 11, p. 5195-8, Nov 2003a.

PIERRO, D. *et al.* Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. *J Gen Virol* [S.I.], v. 87, n. Pt 8, p. 2263-8, Aug 2006a.

PLETNEV, A. *et al.* Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol* [S.I.], v. 67, n. 8, p. 4956-63, Aug 1993a.

PLETNEV, A. *et al.* Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol* [S.I.], v. 67, n. 8, p. 4956-63, Aug 1993.

PLETNEV, A. *et al.* Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 89, n. 21, p. 10532-6, Nov 1992.

PODDER, G. *et al.* Origin of dengue type 3 viruses associated with the dengue outbreak in Dhaka, Bangladesh, in 2000 and 2001. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 74, n. 2, p. 263-5, Feb 2006a.

POSADA, D. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 34, n. Web Server issue, p. W700-3, Jul 2006a.

POSADA, D. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Res* [S.I.], v. 34, n. Web Server issue, p. W700-3, Jul 2006.

PRICE, W. *et al.* The attenuation of the 26th mouse brain passage of New Guinea C strain of dengue 2 virus for use in the sequential immunization procedure against group B arboviruses. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 22, n. 1, p. 92-9, Jan 1973.

REPIK, P. *et al.* RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 32, n. 3, p. 577-89, May 1983.

RESTREPO, B. *et al.* Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. *Rev Soc Bras Med Trop* [S.I.], v. 41, n. 1, p. 6-10, 2008 Jan-Feb 2008.

REY, F. *et al.* The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* [S.I.], v. 375, n. 6529, p. 291-8, May 1995a.

RICO-HESSE, R. *et al.* Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* [S.I.], v. 230, n. 2, p. 244-51, Apr 1997.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* [S.I.], v. 174, n. 2, p. 479-93, Feb 1990.

RIGAU-PÉREZ, J. Clinical manifestations of dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1990-1991. Puerto Rico Association of Epidemiologists. *Rev Panam Salud Publica* [S.I.], v. 1, n. 5, p. 381-8, May 1997a.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. *et al.* Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. *J Virol* [S.I.], v. 84, n. 9, p. 4845-50, May 2010.

ROEHRIG, J. *et al.* Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* [S.I.], v. 246, n. 2, p. 317-28, Jul 1998.

RUSSELL, P.; MCCOWN, J. Comparison of dengue-2 and dengue-3 virus strains by neutralization tests and identification of a subtype of dengue-3. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 21, n. 2, p. 97-9, Jan 1972.

SABIN, A.; SCHLESINGER, R. PRODUCTION OF IMMUNITY TO DENGUE WITH VIRUS MODIFIED BY PROPAGATION IN MICE. *Science* [S.I.], v. 101, n.

2634, p. 640-642, Jun 1945.

SÁNCHEZ-BURGOS, G. *et al.* Cytokine production in brain of mice experimentally infected with dengue virus. *Neuroreport* [S.I.], v. 15, n. 1, p. 37-42, Jan 2004.

SANGKAWIBHA, N. *et al.* Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* [S.I.], v. 120, n. 5, p. 653-69, Nov 1984.

SCHERER, W. The complexity of Arbovirus nomenclature: a proposal to simplify it. *Am J Epidemiol* [S.I.], v. 88, n. 2, p. 145-6, Sep 1968.

SHRESTA, S. *et al.* Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J Immunol* [S.I.], v. 175, n. 6, p. 3946-54, Sep 2005.

SHRESTA, S. *et al.* Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol* [S.I.], v. 78, n. 6, p. 2701-10, Mar 2004.

SHRESTA, S. *et al.* Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol* [S.I.], v. 80, n. 20, p. 10208-17, Oct 2006.

SHURTLEFF, A. *et al.* Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology* [S.I.], v. 281, n. 1, p. 75-87, Mar 2001.

SIERRA, B. *et al.* Secondary heterologous dengue infection risk: Disequilibrium between immune regulation and inflammation? *Cell Immunol* [S.I.], v. 262, n. 2, p. 134-40, 2010.

SOUNDRAVALLY, R. *et al.* Fulminant hepatic failure in an infant with severe dengue infection. *Indian J Pediatr* [S.I.], v. 77, n. 4, p. 435-7, Apr 2010a.

SOUNDRAVALLY, R.; HOTI, S. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. *Hum Immunol* [S.I.], v. 68, n. 12, p. 973-9, Dec 2007a.

SOUZA, D. *et al.* Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 106, n. 33, p. 14138-43, Aug 2009.

SPAULDING, A. *et al.* Analysis of murine CD8(+) T-cell clones specific for the Dengue virus NS3 protein: flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype. *J Virol* [S.I.], v. 73, n. 1, p. 398-403, Jan 1999.

SRICHAIKUL, T.; NIMMANNITYA, S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* [S.I.], v. 13, n. 2, p. 261-76, Jun 2000.

SUH, S. *et al.* [A case of imported Dengue fever with acute hepatitis]. *Korean J*

Hepatol [S.I.], v. 13, n. 4, p. 556-9, Dec 2007.

SUMIYOSHI, H. *et al.* Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. *J Virol* [S.I.], v. 66, n. 9, p. 5425-31, Sep 1992.

SUZUKI, R. *et al.* Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. *Virology* [S.I.], v. 362, n. 2, p. 374-83, Jun 2007a.

SYHAVONG, B. *et al.* The infective causes of hepatitis and jaundice amongst hospitalised patients in Vientiane, Laos. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [S.I.], Apr 2010.
TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* [S.I.], v. 10, n. 3, p. 512-26, May 1993.

TAN, G. *et al.* A non mouse-adapted dengue virus strain as a new model of severe dengue infection in AG129 mice. *PLoS Negl Trop Dis* [S.I.], v. 4, n. 4, p. e672, 2010.

TORRENTES-CARVALHO, A. *et al.* Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [S.I.], v. 104, n. 8, p. 1091-9, Dec 2009.

TRENT, D. *et al.* Genetic variation and microevolution of dengue 2 virus in Southeast Asia. *Virology* [S.I.], v. 172, n. 2, p. 523-35, Oct 1989.

TSAL, J. *et al.* Effect of serotypes on clinical manifestations of dengue fever in adults. *J Microbiol Immunol Infect* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 471-8, Dec 2009.

TWIDDY, S. Comparative population dynamics of mosquito-borne flaviviruses. *Infect Genet Evol* [S.I.], v. 3, n. 2, p. 87-95, Jul 2003.

TWIDDY, S. *et al.* Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol* [S.I.], v. 20, n. 1, p. 122-9, Jan 2003.

TWIDDY, S. *et al.* Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol* [S.I.], v. 20, n. 1, p. 122-9, Jan 2003.

TWIDDY, S.; HOLMES, E. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J Gen Virol* [S.I.], v. 84, n. Pt 2, p. 429-40, Feb 2003.

UBOL, S. *et al.* Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. *J Infect Dis* [S.I.], v. 201, n. 6, p. 923-35, Mar 2010.

UZCATEGUI, N. *et al.* Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol* [S.I.], v. 84, n. Pt 6, p. 1569-75, Jun 2003.

UZCATEGUI, N. *et al.* Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol* [S.I.], v. 84, n. Pt 6, p. 1569-75, Jun 2003.

VAN DER MOST, R. *et al.* Mutagenesis of the RGD motif in the yellow fever virus

17D envelope protein. *Virology* [S.I.], v. 265, n. 1, p. 83-95, Dec 1999.

VASCONCELOS, P. *et al.* A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [S.I.], v. 37, n. 3, p. 253-5, 1995 May-Jun 1995.

VAUGHN, D. *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* [S.I.], v. 181, n. 1, p. 2-9, Jan 2000.

VEZZA, A. *et al.* Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 29, n. 4, p. 643-52, Jul 1980.

VIJAYALAKSHMI, A.; DEVAPRASATH, S. Fulminant hepatic failure in primary dengue infection. *Indian Pediatr* [S.I.], v. 47, n. 3, p. 280, Mar 2010.

VORNDAM, V. *et al.* Restriction enzyme analysis of American region dengue viruses. *Arch Virol* [S.I.], v. 136, n. 1-2, p. 191-6, 1994.

WANG, E. *et al.* Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* [S.I.], v. 74, n. 7, p. 3227-34, Apr 2000.

WATTS, D. *et al.* Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* [S.I.], v. 354, n. 9188, p. 1431-4, Oct 1999.

WITTKKE, V. *et al.* Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* [S.I.], v. 301, n. 1, p. 148-56, Sep 2002.

WU-HSIEH, B. *et al.* Dengue hemorrhage in a mouse model. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 1171 Suppl 1, p. E42-7, Sep 2009a.

YAMSHCHIKOV, V. *et al.* An infectious clone of the West Nile flavivirus. *Virology* [S.I.], v. 281, n. 2, p. 294-304, Mar 2001.

YAUCH, L.; SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res* [S.I.], v. 80, n. 2, p. 87-93, Nov 2008.

YEN, Y. *et al.* Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol* [S.I.], v. 82, n. 24, p. 12312-24, Dec 2008a.

ZHANG, W. *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* [S.I.], v. 10, n. 11, p. 907-12, Nov 2003.

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](#)