



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde



Avaliação de modelos murinos utilizando camundongos imunocompetentes e vírus não adaptados para o estudo da Dengue

Por

Beatriz Senra Álvares da Silva Santos

Belo Horizonte

Maio / 2018

TESE

DCS – IRR B. S. A. S. SANTOS

2018

Avaliação de modelos murinos utilizando camundongos imunocompetentes e vírus não adaptados para o estudo da Dengue

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro do Instituto René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde – área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Marco Antônio da Silva Campos, IDV – IRR

Coorientadores: Dra. Erna Geessien Kroon, Dep. Microbiologia, ICB – UFMG, Dra. Érica Alessandra Rocha Alves, LICM – IRR

Colaboradores: Dr. Pedro Augusto Alves, IDV – IRR, Dr. Alexandre Vieira Machado- IRR

Belo Horizonte, 2018

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do IRR

CRB/6 1975

S237a
2018

Santos, Beatriz Senra Álvares da Silva.

Avaliação de modelos murinos utilizando camundongos imunocompetentes e vírus não adaptados para o estudo da Dengue/ Beatriz Senra Álvares da Silva Santos – Belo Horizonte-MG, 2018.

XVIII, 120 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 94-103

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro do Instituto René Rachou, Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Dengue Vírus 2. modelo animal 3. citocinas 4. I. Título II. Campos, Marco Antonio da Silva . III. Kroon, Erna Geessien IV. Alves, Érica Alessandra Rocha.

CDD – 22. ed. – 616.918

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedico este trabalho à minha família,
em especial aos meus queridos pais, que tanto amo e
por tudo que são e representam pra mim.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

Aos meus queridos pais, Santos e Valdi, por serem um exemplo de amor, determinação e vida, e por sempre colocarem as minhas necessidades a frente da deles, me ajudando e me apoiando incondicionalmente. Sem eles, nada disto seria possível. Terão minha eterna gratidão, admiração e amor.

Ao meu amado marido Lucio, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e acreditando sempre no meu potencial.

Aos meus filhos tão amados por toda paciência ao longo desta caminhada.

Aos meus queridos amigos Natalia Lucinda, Natalia Lima, Thais Silva, Gustavo Pereira, Ketyllen Reis, Marcele e Paula Laice por me ajudarem e me apoiarem ao longo desta jornada. Vocês são incríveis!

Aos novos amigos que chegaram na reta final mas também se tornaram muito especiais: Sabrynna Brito e Andreza Parreiras, obrigada pelo apoio e incentivo sempre.

Ao Danilo Bretas de Oliveira, pelo incentivo, colaboração e ajuda de sempre.

À querida Paula Marinho por todos os ensinamentos e ajuda durante estes anos.

Ao Bruno Galvão Filho pelo incentivo, apoio e ajuda com os ensaios de CBA.

À todos os estudantes de Iniciação Científica que ajudaram ao longo desta caminhada em especial: Arthur Molinari, Lídia Faustino, Ianca Paula, Andreza Parreiras, Nathalia Guimarães e Phelipy Marques.

À equipe do biotério, Ana Carolina Peixoto, Fernanda Trindade, Neviton Neves, Ana Paula Araújo, Rosângela Pereira e Samuel Matias, pela ajuda e disponibilidade de sempre.

À querida Clécia de Oliveira, Raquel Horsth e Lídia Ferreira, por todo suporte nos momentos que precisei.

Ao meu orientador Dr. Marco Antônio da Silva Campos por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, paciência e orientação, serei eternamente grata.

Às minhas co-orientadoras Dr^a Erna Geessien Kroon e Dr^a Érica Alessandra Alves Rocha, pelo apoio, orientação, disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

Aos Drs. Alexandre de Magalhães Vieira Machado e Pedro Augusto Alves pela ajuda e disponibilidade de sempre com seus valorosos ensinamentos.

A toda equipe do Laboratório de Imunologia de Doenças Virais – IDV- por me receberem tão bem, me apoiarem e me auxiliarem sempre que precisei.

Às plataformas de PCR em Tempo Real e de Citometria de fluxo

À CAPES, pela concessão da minha bolsa, e à FAPEMIG, CNPq, INCTV, Fiocruz pelo suporte financeiro concedido para a realização deste trabalho.

A todos que me ajudaram de alguma maneira, meu muito obrigado.

E acima de tudo, agradeço a Deus por estar sempre presente na minha vida e por me conceder esta oportunidade de estudo e realização profissional.

RESUMO

Existem vários modelos murinos para estudar dengue. Alguns deles utilizam camundongos imunologicamente deficientes ou humanizados, enquanto outros grupos utilizam vírus modificados. Nosso grupo relatou anteriormente um inoculo intracraniano de DENV altamente virulento em camundongos imunologicamente competentes (C57BL/6), causando a morte dos camundongos. A infecção intracraniana realizada no presente trabalho teve o intuito de comparar a perda de peso ocorrida com este tipo de infecção previamente descrita com a perda de peso obtida após a inoculação subcutânea, utilizando a mesma amostra de camundongos e o mesmo vírus altamente virulento. Neste trabalho, apresentamos um modelo com os mesmos camundongos C57BL/6 usados anteriormente, infectados por via subcutânea com DENV altamente virulento. Neste modelo murino de inoculo subcutâneo, os níveis de citocinas, o hemograma e a produção de óxido nítrico, juntamente com a medida da perda de peso e de mortalidade, foram utilizados para a comparação dos animais infectados em relação aos não infectados, permitindo uma melhor compreensão da doença. Os camundongos foram inoculados pela via intracraniana ou subcutânea e avaliados pelos sinais clínicos da dengue. O hemograma foi realizado pela coloração panótica dos leucócitos para a contagem diferencial e contagem total de leucócitos, hemácias e plaquetas foram realizadas em câmara de Neubauer. As citocinas foram medidas por citometria de fluxo e PCR quantitativa (qPCR). O óxido nítrico foi medido pela reação de Griess após exposição de macrófagos murinos ao vírus. Os camundongos infectados com DENV subcutaneamente apresentaram perda de peso, mas não apresentaram nenhum outro sinal clínico. Embora o número de hemácias não tenha sido diferente entre camundongos infectados e não infectados nos camundongos por via subcutânea, o número de leucócitos e de plaquetas diminuiu após a infecção. As citocinas TNF alfa e IFN gama aumentaram após a infecção subcutânea. A infecção subcutânea protegeu os camundongos de uma segunda infecção com o vírus por via intracraniana. A titulação viral no cérebro após a infecção intracraniana ou a soro-neutralização após a infecção subcutânea foram realizadas para confirmar a infecção dos camundongos. Também estudamos um modelo de infecção utilizando a picada do mosquito (previamente infectado com DENV) em camundongos. O resultado neste modelo foi um aumento da expressão de *nos2* no cérebro dos camundongos infectados através desta picada de *Aedes aegypti* infectados. Foi observada também uma maior produção de óxido nítrico *ex vivo* nos macrófagos de C57BL/6, quando estimulados com DENV, em comparação com a produção em macrófagos não estimulados. Concluindo, o modelo subcutâneo apresentado neste trabalho tem suas limitações, como todos os outros modelos já mencionados na literatura, mas é um novo modelo, que usa camundongos imunologicamente competentes, sendo infectados pela via subcutânea com um DENV altamente infeccioso, resultando em alterações no peso, produção de IFN gama e TNF alfa e diminuição do número das plaquetas. Este modelo subcutâneo apresentado é um modelo adicional interessante para o estudo da resposta imune contra dengue.

Palavras-chave: dengue vírus, modelo murino, citocinas, parâmetros hematológicos.

ABSTRACT

Various mouse models to study dengue have been described by different authors, some of them using immunodeficient or some using humanized mice. Our group reported previously a deadly murine model, which used the intracranial inoculum of highly virulent *Dengue virus* (DENV) in immune competent mouse. Here we present a model of immune competent mouse (C57BL/6), infected subcutaneously by the same highly virulent DENV (DENV3 genotype I). In this immunocompetent systemic mice model, the cytokine levels and hematological parameters such as total and differential leukocyte and platelets counts, together with weight loss, were considered important monitoring parameters, allowing a better understanding of the systemic human disease. Mice were inoculated subcutaneously and evaluated by the percentage weight variation as well as the clinical signs. The hemogram was performed by the panoptic coloration of the leukocytes for the differential count and the total counts of leukocytes, red cells and platelets were performed in Neubauer's chamber. Cytokines were measured by flow cytometry and quantitative PCR (qPCR). Nitric oxide was measured by the Griess reaction after exposure of murine macrophages to the virus. Hematological parameters and cytokines levels were measured and viral titration in brain tissue or serum neutralization were performed to confirm mice infection. The subcutaneously DENV inoculated mice showed weight loss after infection, but they did not show any other clinical signs. Although the number of red cells was not different between infected and uninfected mice in the infected subcutaneous mice, the number of leukocytes and platelets decreased after infection. The leukocytes and platelets decreased after subcutaneous inoculation. The cytokines TNF alpha and IFN gamma increased after infection in mice. We also studied a model of infection using the mosquito bite (previously infected with DENV) in mice. The result in this model was an increase in *nos2* expression in the brain of infected mice through this infected *Aedes aegypti* bite. A higher production of ex vivo nitric oxide was also observed in the C57BL/6 macrophages when stimulated with DENV compared to the production in unstimulated macrophages. The subcutaneous model provided scope for improved understanding of the dengue pathogenesis, as well as possible mechanism for protection to subsequent mouse infected by intracranial route in mice. This model could be used to study the vertebrate immune response and evaluation of drugs or vaccine against dengue virus.

Keywords: *Dengue virus*, murine model, cytokines, hematological parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da Dengue no mundo (2016).....	21
Figura 2: O ciclo urbano do DENV em humanos e mosquitos.	23
Figura 3: Representação da partícula viral do DENV.	24
Figura 4: Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero Flavivirus.	25
Figura 5: Ciclo de multiplicação dos flavivirus.....	29
Figura 6: Países e áreas de risco para Dengue.....	32
Figura 7: Critérios de diferenciação da Dengue com ou sem sinais de alarme e Dengue grave.	34
Figura 8: Exemplo de via de entrada do DENV em suas células hospedeiras.	38
Figura 9: ADE na infecção por DENV.....	39
Figura 10: Ilustração da infecção intracraniana em camundongos.....	58
Figura 11: Imagem inóculo subcutâneo.....	58
Figura 12: Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 infectados com DENV neurotrópicos.	69
Figura 13: Curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 infectados com DENV neurotrópicos.	69
Figura 14: Camundongos C57BL/6 com sinais clássicos de encefalite causada por DENV.....	71
Figura 15: Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 infectados com DENV3 genótipo I por via subcutânea (SC).....	72
Figura 16: Contagem de leucócitos, glóbulos vermelhos e plaquetas após inoculação subcutânea de DENV.	73
Figura 17: Contagem de linfócitos, monócitos e neutrófilos após inoculação subcutânea de DENV.	75
Figura 18: Citocinas são produzidas no baço e no fígado de camundongos, após o inóculo de DENV via SC.	76

Figura 19: Dosagem de transaminases no soro de camundongos C57BL/6 após infecção subcutânea.....	77
Figura 20: Infecção de camundongos com <i>Aedes aegypti</i>	78
Figura 21: mRNA de DENV no baço de camundongos C57BL/6 infectados pela picada de <i>Aedes aegypti</i> previamente infectados com 400 u.f.p. de DENV3 genótipo I.	79
Figura 22: mRNA de nos2 no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados pela picada de <i>Aedes aegypti</i> previamente infectados com 400 u.f.p. de DENV3 genótipo I	80
Figura 23: Produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos peritoneais ex vivo de camundongos selvagens C57BL/6.	81
Figura 24: Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 infectados com DENV3 genótipo I via IC 14 dias após infecção subcutânea.	82
Figura 25: mRNA de DENV no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com DENV3 genótipo I por diferentes vias e no fígado por via SC.	84
Figura 26: mRNA de IFN γ no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados.	85
Figura 27: mRNA de nos2 no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados por via SC-IC.	86
Figura 28: Produção de TNF- α no baço, após o inóculo de DENV via SC-IC.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais características de NS1 e das outras proteínas não estruturais de DENV.....	28
Tabela 2: PAMPs e PRRs e seus respectivos TLRs	36
Tabela 3: Diferentes modelos murinos de infecção com DENV	42
Tabela 4: Lista de iniciadores utilizados na qPCR.....	62
Tabela 5: Título viral e Soroneutralização	83

ABREVIATURAS

ADE - Antibody-dependent enhancement (Facilitação dependente de Anticorpos)

APC – Antigen-presenting cell (Célula apresentadora de antígeno)

BOD – Demanda biológica de oxigênio

C – Proteína do capsídeo

CBA – Cytometric Beads Array

CD4 – Cluster of differentiation 4 (co-receptor de células de defesa)

CD8 – Cluster of differentiation 8 (co-receptor de células de defesa)

cDNA – DNA complementar

CECAL – Centro de Criação de animais de Laboratório

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CG – Complexo de Golgi

CMC – Carboxi-metil-celulose

cNOS – Óxido nítrico sintase constitutiva

CS – Sequências conservadas

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais (FIOCRUZ)

DC – Dendritic cell (Célula dendrítica)

DENV – *Dengue virus*

DENV-1 – *Dengue virus 1*

DENV-2 – *Dengue virus 2*

DENV-3 – *Dengue virus 3*

DENV-4 – *Dengue virus 4*

DF – Febre do Dengue

DHF – Dengue hemorrágica

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbeco)

DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfato

d.p.i. – Dias após infecção

DI – domínio I

DII – domínio II

DIII – domínio III

E – Proteína do Envelope

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetracético)

FD – Febre do dengue (DF dengue fever)

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue (DHF dengue haemorrhagic fever)

g – Força gravitacional

GRP78 – Glucose regulated protein 78 (Proteína 78 regulada pela glicose)

HE – Hematoxilina/Eosina

HPRT – Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

Hsp70 – Heat Shock Protein 70 (proteína de choque térmico 70)

Hsp90 – Heat Shock Protein 90 (proteína de choque térmico 90)

I – infectados

ICTV – Comitê internacional de Taxonomia de Vírus

IFN – Interferon

IFN α – Interferon alfa

IFN β – Interferon beta

IFN γ – Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

iNOS ou NOS2 – Inducible nitric oxide synthase (Óxido nítrico sintase induzível)

JEV – Japanese encephalite virus

KDa – Kilodaltons

LPS – Lipopolissacarídeos

L-15 – Meio Leibowitz-15

M – Proteína da Membrana

M-MLV RT – Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
(Transcriptase reversa do Moloney murine leukemia virus)

m.o.i – Multiplicity of infection (Multiplicidade de infecção)

mL – Mililitro

mM – Milimolar

μL – Microlitro

μg/mL – Micrograma/mililitro

min – minutos

mRNA – RNA mensageiro

MyD88 – Myeloid differentiation factor 88 (Fator de diferenciação mielóide 88)

ng – Nanograma

NI – Não infectados

nm – Nanômetro

NO – Nitric oxide (Oxido Nitrico)

NOS – Óxido nítrico sintase

NS1 – Proteína não estrutural 1

NS2A – Proteína não estrutural 2A

NS2B – Proteína não estrutural 2B

NS3 – Proteína não estrutural 3

NS4A – Proteína não estrutural 4A

NS4B – Proteína não estrutural 4B

NS5 – Proteína não estrutural 5

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Janela aberta de leitura

pb – Pares de bases

PBS – Phosphate-buffered saline (Tampão fosfato salino)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PM – Peso molecular

prM – Proteína precursora da proteína M

qPCR – PCR quantitativa ou PCR em tempo real

RE – Retículo Endoplasmático

RER – Retículo endoplasmático rugoso

RNA – Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)

rpm – Rotações por minuto

RT – Reverse transcription (Transcrição reversa)

SDC – Síndrome do Choque da Dengue

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

T_m – Melting temperature (Temperatura de dissociação)

TNF – Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral)

u.f.p. – unidades formadoras de placa

U/mL – Unidades/mililitro

UTR – Região terminal não codificadora

WHO – Organização Mundial de Saúde

WNV – West Nile virus

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Contextualização – Dengue vírus	19
1.2. Dengue vírus.....	23
1.2.1. Vírus da Família Flaviviridae.....	23
1.2.2. Partícula viral e genoma.....	24
1.2.3. Proteínas virais estruturais	25
1.2.4. Estrutura e função das proteínas não estruturais NS.....	27
1.2.5. Ciclo de multiplicação do vírus da Dengue	28
1.2.6. Sorotipos do DENV.....	30
1.3. Transmissão e epidemiologia da doença.....	30
1.4. Manifestações clínicas da Dengue	33
1.5. Patogênese e resposta imune.....	34
1.5.2. ADE - Antibody-dependent enhancement (Facilitação dependente de Anticorpos)	39
1.6. Modelo animal para estudo de infecção por DENV.....	40
2. JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS.....	47
3.1. Objetivo Geral:	47
3.2. Objetivos específicos:.....	47
4. METODOLOGIA.....	48
4.1. Estratégias de trabalho.....	48
4.1.1. Curva de sobrevivência e variação percentual de peso de camundongos infectados com DENV por via intracraniana (IC), subcutânea (SC) e subcutânea-intracraniana (SC-IC).....	48
4.1.2. Produção de Óxido Nítrico	50
4.1.3. Infecção subcutânea com DENV 3 genótipo I, em camundongos C57BL/6	51
4.1.4. Infecção experimental de camundongos com mosquitos <i>Aedes aegypti</i> infectados com DENV 3 genótipo I.....	52
4.1.5. Infecção subcutânea e posterior infecção IC com DENV 3 genótipo I, em camundongos C57BL/6	53
4.2. Cultivo celular	54
4.2.1. Células C6/36.....	54
4.2.2. Células BHK-21.....	54
4.3. Vírus	54

4.5. Titulação (Determinação de Unidades Formadoras de Placa – u.f.p.).....	55
4.6. Camundongos	56
4.7. Comitê de Ética.....	57
4.8. Anestesia	57
4.9. Infecção intracraniana murina (IC) com DENV	57
4.10. Infecção subcutânea murina (SC) com DENV	58
4.11. Infecção experimental de camundongos com picadas de mosquitos Aedes aegypti infectados com DENV 3 genótipo I.....	59
4.12. Extração de RNA	60
4.13. Tratamento do RNA com DNase	60
4.14. Transcrição Reversa (RT)	61
4.15. PCR em Tempo Real (qPCR).....	61
4.16. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por reação de Griess.....	62
4.16.1. Obtenção de macrófagos intraperitoneais de camundongos	63
4.16.2. Quantificação da produção de óxido nítrico pela Reação de Griess..	64
4.17. Teste de Soroneutralização (PRNT50) para DENV-3.....	64
4.18. Cytometry Beads Array - (CBA).....	65
4.19. Contagem de células sanguíneas.....	66
4.20. Atividade das transaminases aspartato aminotransferase e alanino aminotransferase	66
4.21. Análises Estatísticas	67
5. RESULTADOS	68
5.1. Modelo de infecção por via intracraniana de camundongos imunocompetentes	68
5.1.1. Variação percentual de peso e curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 infectados com DENV por via intracraniana.....	68
5.1.2. Sinais clínicos de encefalite em camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com DENV 3 genótipo I.....	70
5.2. Infecção subcutânea em camundongos C57BL/6 infectados com DENV 3 genótipo I.....	72
5.2.1. Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea com DENV 3 genótipo I.....	72
5.2.2. Alterações hematológicas em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea com DENV 3 genótipo I.....	73
5.2.3. Produção de citocinas em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea com DENV 3 genótipo I.....	75
5.2.4. Alterações hepáticas em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea com DENV 3 genótipo I.....	77

5.3. Infecção subcutânea experimental de camundongos com mosquitos Aedes aegypti infectados com DENV 3 genótipo I.....	78
5.3.1. Detecção do mRNA do vírus e de nos2, por qPCR, em camundongos C57BL/6 picados por Aedes aegypti fêmeas infectadas	79
5.4. Produção de Óxido Nítrico em macrófagos intraperitoneais	80
5.5. Infecção com DENV 3 genótipo I, via subcutânea seguida de via intracraniana em camundongos C57BL/6	81
5.5.1. Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 infectados por via SC-IC com DENV 3 genótipo I	81
5.5.2. Titulação viral e soro-neutralização em camundongos C57BL/6 infectados com DENV 3 genótipo I.....	83
5.5.3. Detecção do mRNA viral, IFN γ e nos2, por qPCR, em camundongos C57BL/6 infectados por via SC-IC com DENV 3 genótipo I.....	84
5.5.4. Produção de TNF- α em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea e posteriormente por IC com DENV 3 genótipo I.....	86
6. DISCUSSÃO	88
7. CONCLUSÃO	91
8. PERSPECTIVAS.....	93
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
9. ANEXOS.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização – Dengue vírus

O agente etiológico da dengue é o *Dengue virus* (DENV), membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Esta família engloba arbovírus de grande importância médica, tais como, o vírus da febre amarela (*Yellow fever virus*; YFV) os vírus da encefalite japonesa (*Japanese encephalitis virus*; JEV); vírus da encefalite de Saint Louis (*St. Louis encephalitis virus*; SLEV); vírus do Oeste do Nilo (*West Nile virus*; WNV) dentre outros (KYLE; HARRIS, 2008; MURPHY; WHITEHEAD, 2011). O DENV possui quatro sorotipos conhecidos, e sua diferenciação é baseada no anticorpo neutralizante produzido no corpo humano após a infecção com DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; MESSINA et al., 2014; SOLANKI; SHANKAR; HIMANSHU, 2017; XAVIER et al., 2014), sendo que a infecção por um determinado sorotipo, outra infecção subsequente por dengue, é incapaz de conferir proteção cruzada duradoura contra os demais sorotipos.

É um vírus transmitido aos seres humanos através da picada das fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*. A infecção por DENV é uma das principais causas de doenças em áreas tropicais e subtropicais, com uma estimativa de 50 milhões de infecções que ocorrem a cada ano e mais de 2,5 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco. A infecção por qualquer dos quatro sorotipos de DENV na maioria dos casos é assintomática ou pode resultar em um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam desde uma forma mais branda (conhecida como febre do dengue – DF, até as formas mais graves da doença, as quais se caracterizam por coagulopatia, aumento da permeabilidade vascular (dengue hemorrágica - DHF), podendo progredir para choque hipovolêmico (síndrome do choque da dengue – DSS) (BHATT et al., 2012; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

O relevante crescimento da dengue nos países endêmicos da Ásia e da América Latina tem importante impacto econômico e sobrecarrega os sistemas públicos de saúde de diferentes países, os quais, em sua maioria, são países em desenvolvimento, cujas economias são menos robustas, causando

significativo impacto econômico e social nas áreas endêmicas (MESSINA et al., 2014; SOLANKI; SHANKAR; HIMANSHU, 2017).

A dengue é atualmente uma das doenças negligenciadas de maior impacto mundial, sendo que sua incidência teve um aumento de mais de 30 vezes nas últimas décadas, conforme mostrado na Figura 1 (BHATT et al., 2012; BRADY et al., 2012).

A dengue é a arbovirose de maior morbidade e mortalidade humana em todo o mundo. Estima-se que 3,97 bilhões de pessoas que vivem em 128 países correm o risco de contrair dengue, sendo que 400 milhões de infecções e 96 milhões de casos sintomáticos ocorrem todos os anos. As infecções por dengue ocorrem em mais de 100 países da região Ásia-Pacífico, Américas, Oriente Médio e África sendo que há um aumento da incidência da dengue, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais do globo (DICK et al., 2012; YARO, 2016; GUZMAN et al., 2016).

Na segunda metade do século XX, a transmissão do DENV seguiu a propagação de seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, cuja disseminação foi facilitada pela urbanização e pela globalização (MESSINA et al., 2014).

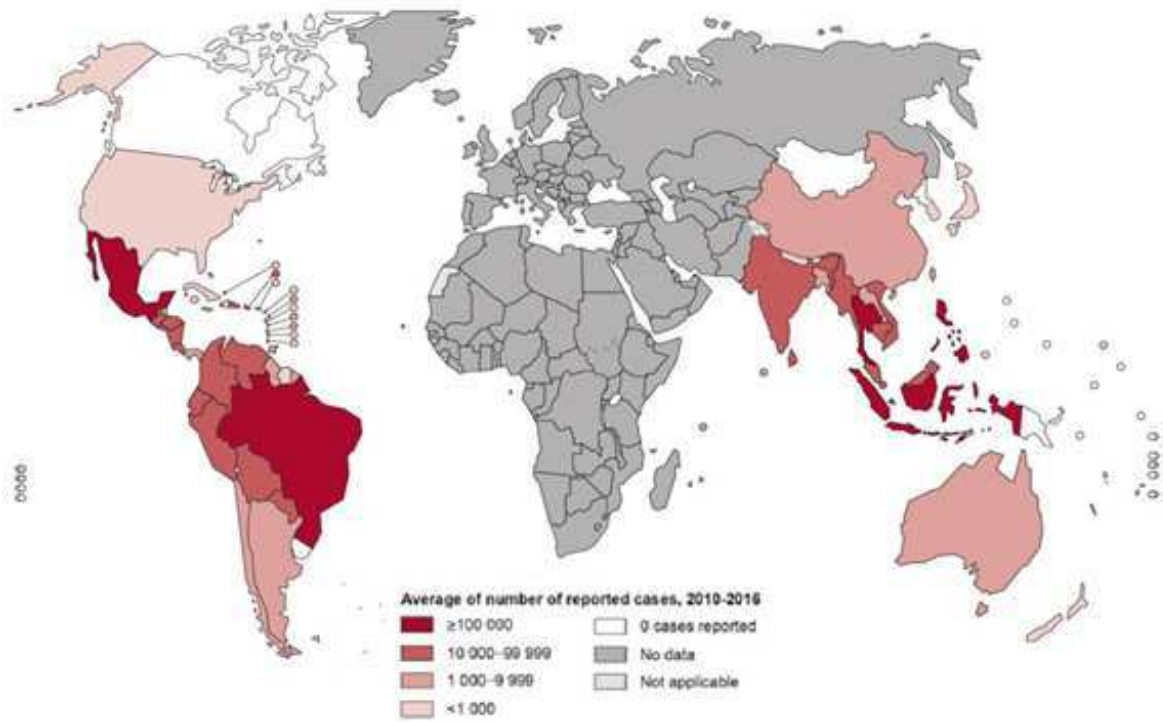


Figura 1: Distribuição da Dengue no mundo (2016). O mapa acima apresenta a distribuição da Dengue no mundo, sendo possível observar sua ampla distribuição nas regiões tropicais e sua alta incidência no Brasil (BHATT et al., 2012; BRADY et al., 2012).

O Brasil é um país tropical na sua totalidade. Por causa de seu clima quente e úmido, ele fornece um habitat altamente favorável para a proliferação do mosquito *A. aegypti*. Ainda que as infecções pelo DENV ocorram durante todo o ano, a maioria dos surtos e os níveis mais altos de infestação vetorial mostram um notável padrão sazonal, ocorrendo durante a estação chuvosa brasileira, de dezembro a maio (FARES et al., 2015).

A maioria dos flavivírus é mantida na natureza como zoonoses silvestres que ocasionalmente podem atingir o homem e animais domésticos. Os DENV são exceções a esse padrão e são a causa de grandes epidemias urbanas. Neste sentido, a disseminação de vírus e vetores no país e os surtos de dengue ocorreram em todas as regiões, incluindo as áreas mais populosas do Brasil (FIGUEIREDO, 2000; GUZMAN et al., 2016). O ciclo urbano da dengue, conforme exemplificado na Figura 2 (GUZMAN et al., 2016), tem efeito direto na ampla disseminação da doença, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, promovendo assim a manutenção das endemias em países cujo controle do mosquito vetor não é feito de maneira eficaz.

Após o repasto sanguíneo em uma pessoa infectada, segue-se um período de incubação extrínseco, o qual dura de 8 a 12 dias, quando o mosquito se torna capaz de transmitir o vírus a outro ser humano. O mosquito, uma vez infectado, assim permanecerá por toda a sua vida, a qual pode chegar a semanas. Durante esse período, o mosquito poderá infectar as pessoas a cada repasto sanguíneo GUZMAN et al., 2016.

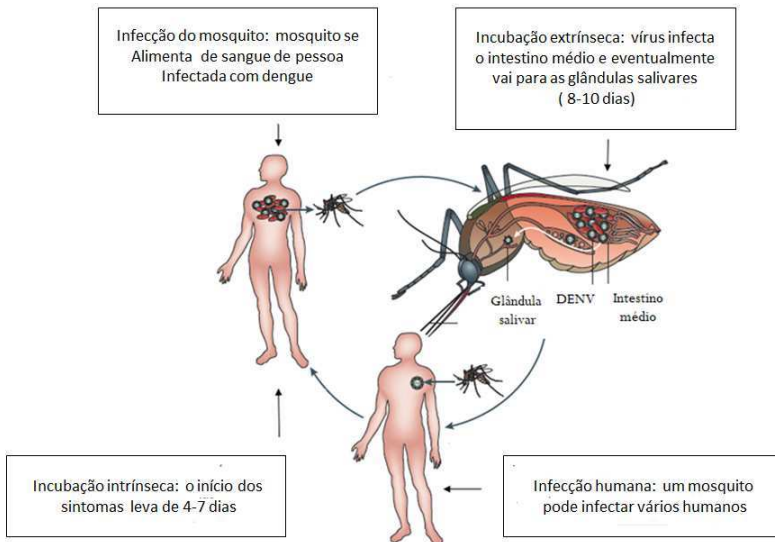


Figura 2: O ciclo urbano do DENV em humanos e mosquitos. O mosquito *Aedes aegypti* pode ser infectado quando a fêmea faz o repasto sanguíneo em uma pessoa na fase de viremia da infecção. Durante a fase extrínseca do ciclo, o DENV infecta primeiramente as células do intestino do mosquito e outros tecidos para depois migrar para as glândulas salivares. Um mosquito infectado pode transmitir dengue para vários seres humanos durante o repasto sanguíneo (GUZMAN et al., 2016).

1.2. Dengue virus

1.2.1. Vírus da Família Flaviviridae

O vírus da dengue pertence à família Flaviviridae, a qual, por sua vez é composta por quatro gêneros: Flavivirus, Pestivirus, Hepacivirus e Pegivirus (FIELDS, BERNARD N. & KNIPE, 2013 - https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus; acesso em 20-05-2018).

O gênero Flavivirus abrange mais de 50 espécies, sendo que a maioria dos flavivírus são arbovírus, isto é, vírus transmitidos por artrópodes, sendo mais da metade transmitida por mosquitos e aproximadamente um terço, por carrapatos (FIELDS, BERNARD N. & KNIPE, 2013).

1.2.2. Partícula viral e genoma

Os vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, são vírus envelopados cujo genoma é constituído por RNA de fita simples e polaridade positiva (REKHA et al., 2016) Figura 3.

A estrutura da partícula viral do DENV é relativamente simples, semelhante aos outros flavivírus. Os vírions são envelopados, esféricos, possuem um capsídeo icosaédrico e apresentam um diâmetro de aproximadamente 50nm (MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

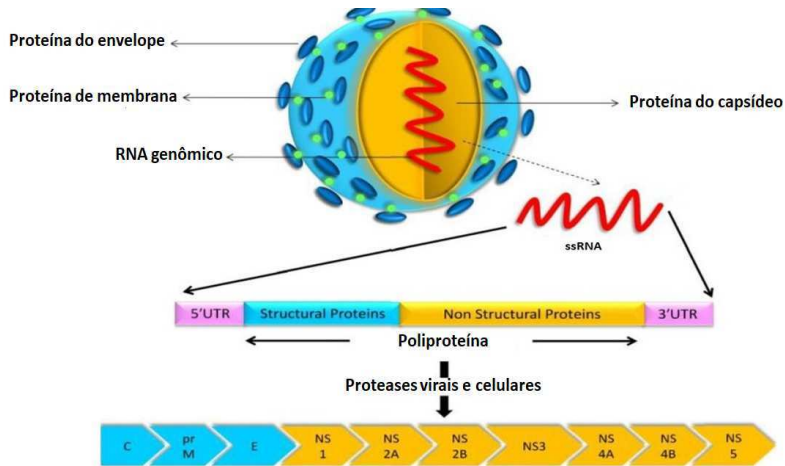


Figura 3: Representação da partícula viral do DENV. Organização do genoma do *Flavivirus* e processamento da poliproteína. O RNA do vírion é de cerca de 11 kb. No topo está o genoma viral com as regiões codificadoras das proteínas estruturais e não estruturais. (Adaptado de REKHA et al., 2016).

A fita de RNA de sentido positivo é constituída de cerca de 11 mil nucleotídeos organizados em uma única fase de leitura aberta (ORF - do inglês Open Reading Frame) que codifica uma única poliproteína de 3.386 aminoácidos, sendo esta poliproteína flanqueada por duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR; Figura 4). A região 5' UTR (do inglês untranslated region, região não traduzida) possui 96 nucleotídeos e a região 3' UTR possui

451 nucleotídeos. A poliproteína produzida a partir da ORF é posteriormente processada por proteases virais e celulares em dez proteínas (Figura 4), sendo: três proteínas estruturais distintas e envolvidas na formação da partícula viral: Capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E); e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (CLYDE; HARRIS, 2006; GUZMAN et al., 2016; MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012).

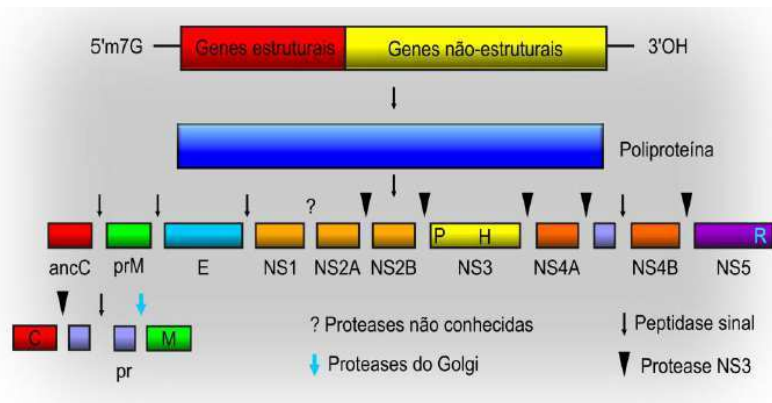


Figura 4: Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero Flavivirus. Ocorre a tradução de uma única poliproteína que é posteriormente clivada por proteases virais e celulares. As abreviações C, E, prM e NS indicadas na figura, representam os genes que codificam para proteínas do Capsídeo (C), Envelope viral (E) e pré-membrana (prM), relacionadas à montagem da partícula viral e finalmente, as proteínas não-estruturais (NS) que se relacionam à replicação do vírus. Adaptado de https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus_acesso_em_23-11-2017.

1.2.3. Proteínas virais estruturais

A entrada do genoma do DENV no citoplasma do hospedeiro é um processo de várias etapas que se inicia com a interação da partícula viral com os receptores celulares. São receptores celulares conhecidos para o DENV: a molécula de adesão de células dendríticas (DC-SIGN), o receptor de manose dos macrófagos (MR), e as proteínas induzidas pelo estresse, como proteínas do choque térmico HSP70 e HSP90 e também a GRP78 (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015a). A partícula viral é internalizada através de vias distintas

dependendo do hospedeiro e do sorotipo do vírus. Essas vias incluem a endocitose mediada por clatrina, endocitose independente de clatrina ou macropinocitose. Durante o tráfico endocítico, o pH do meio endossomal é acidificado provocando alterações conformacionais da proteína E, que por sua vez, induz a fusão entre a membrana endossomal e a membrana do vírus (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015b).

O interior da partícula viral é formado por RNA e pelo capsídeo, os quais são envoltos por uma membrana na qual estão ancoradas a proteína M e a proteína E. A proteína E trabalha nas interações vírus-hospedeiro durante as etapas de interação e penetração da partícula viral nas células hospedeiras (TAY; VASUDEVAN, 2018).

A proteína E localiza-se na superfície do DENV e possui 3 domínios (DI-DIII), sendo que o domínio DIII é o responsável pela ligação da partícula viral aos receptores das células do hospedeiro. A junção que liga DI a DII é altamente flexível e é usada para manobrar o DII no ambiente de baixo pH do endossoma, conduzindo a exposição do domínio DII para a fusão. Este ciclo de fusão interage com a membrana endossomal facilitando a fusão do vírus com esta membrana, permitindo que o RNA do vírus seja liberado no citoplasma da célula hospedeira (BALSITIS et al., 2010; CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015b; GUZMAN et al., 2016).

A glicoproteína prM é precursora da proteína M. A clivagem do peptídeo pr gera a proteína M madura. Esta clivagem é mediada pela protease furina, sendo necessária para a maturação do vírus (SOLANKI; SHANKAR; HIMANSHU, 2017). As novas partículas de DENV geradas durante a infecção podem conter a proteína M de superfície processada e serem infecciosas ou maduras, ou manter a forma não clivada do precursor da proteína M (prM) na sua superfície e permanecerem na forma imatura. Algumas partículas virais podem ter uma mistura de proteína M e proteína prM em sua superfície e essas partículas podem ser ou não infecciosas (GUZMAN et al., 2016).

1.2.4. Estrutura e função das proteínas não estruturais NS

As proteínas não estruturais (NS) são responsáveis pela replicação do RNA viral, auxiliam na montagem da partícula viral e também atuam na evasão da resposta imune do hospedeiro. A NS1 é uma glicoproteína necessária no processo de replicação do RNA viral, podendo ancorar-se no retículo endoplasmático, sendo encontrada associada à membrana ou na sua forma secretada (sNS1) (Tabela 1). A NS1 é uma glicoproteína de 46 kDa e existe em 3 formas: a forma ER-residente (retículo endoplasmático-residente), a forma ancorada à membrana e a forma secretada. A NS1 é inicialmente sintetizada como um monômero solúvel e associa-se à membrana após a dimerização no lúmen do retículo endoplasmático. Intracelularmente, a NS1 participa da replicação precoce do RNA viral. A NS1 também é transportada para a superfície da célula, onde permanece associada à membrana ou é secretada (sNS1) em uma conformação hexamérica associada a lipídeos solúveis. A sNS1 pode ser detectada no sangue de pacientes infectados a partir do primeiro dia de sintomas e circula em níveis de ng/mL a mg/mL, durante a fase aguda da infecção e os níveis séricos de NS1 correlacionam-se com a gravidade da doença, assim como com a carga viral (GUZMAN et al., 2016).

A NS1 também pode atuar através do receptor de TLR4 em células mononucleares onde induz a secreção de citocinas (AVIRUTNAN et al., 2006; GLASNER et al., 2017; GUZMAN et al., 2016).

A NS2A e NS2B são dois polipeptídeos hidrofóbicos, os quais são clivados por proteases virais, sendo que a NS2A é envolvida na replicação do RNA viral e a NS2B é um co-fator para NS3 (GUZMAN et al., 2016).

A NS3 é uma proteína multifuncional com atividades serino-protease e helicase. O domínio intermediário da NS3 é uma nuclease, necessária para a replicação do RNA e o domínio C-terminal tem atividade RNA trifosfatase (GUZMAN et al., 2016).

A NS4A (requerida para a formação de vesículas para a replicação) e NS4B (suprime a sinalização de IFN β e IFN γ) são polipeptídeos hidrofóbicos que estão associados com a membrana (GUZMAN et al., 2016).

A NS5 é a maior e mais conservada proteína do vírus da Dengue e tem a função de RNA polimerase RNA-dependente (DALRYMPLE; CIMICA; MACKOW, 2015; NEMÉSIO; PALOMARES-JEREZ; VILLALAÍN, 2012; SCATURRO et al., 2015; TERAMOTO et al., 2017; VIONETTE; DANSA-PETRETSKI, 2012; YE; LI; CHEN, 2017).

Tabela 1: Principais características de NS1 e das outras proteínas não estruturais de DENV (GUZMAN et al., 2016) modificado.

Proteína	Tamanho (kDa)	Principais características	Principais funções
NS1	46	Pode ancorar-se no retículo endoplasmático, e é associada à membrana ou secretada (sNS1)	NS1 é envolvida com a replicação do RNA viral e a sNS1 ativa o sistema imune inato e está implicada no derrame vascular
NS2A	22	Proteína de membrana hidrofóbica	Envolvida na replicação do RNA
NS2B	14	Pequena proteína hidrofóbica	Co-fator para NS3
NS3	69	Proteína multifuncional com vários domínios catalíticos	Envolvida com as funções da helicase e nucleotídeo trifosfatase durante a síntese de RNA
NS4A	16	Proteína de membrana integral hidrofóbica	Necessária para a formação de vesículas para a replicação
NS4B	30	Pequena proteína hidrofóbica	Suprime a sinalização de IFN β e IFN γ
NS5	105	A maior e mais conservada proteína do vírus da Dengue	Envolvida na síntese de RNA e no bloqueio dos sistemas de IFNs

1.2.5. Ciclo de multiplicação do vírus da Dengue

O DENV infecta principalmente células imunes de linhagem mieloide, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, além de hepatócitos e células endoteliais (GREEN et al., 2014). A multiplicação do vírus inicia-se com a adsorção do DENV aos receptores celulares (sendo essa interação mediada pela proteína E) e internalização por endocitose. O baixo pH do compartimento endossomal desencadeia a fusão da membrana da célula hospedeira com a membrana do envelope viral, através da mudança conformacional da proteína

E, expondo um peptídeo de fusão e levando ao desnudamento do vírus com a consequente liberação do complexo ribonucleoprotéico no citoplasma da célula infectada. A tradução do RNA gera uma poliproteína que é clivada pela serina-protease codificada pelo vírus (NS2B/NS3), e pelas peptidase sinalase e protease furina, codificadas pelas células hospedeiras (LINDENBACH et al, 2013; PERERA et al, 2008; GUZMAN et al., 2016; MURI, 2014).

Uma vez que a polimerase viral NS5 (RNA polimerase RNA dependente) foi traduzida e liberada a partir do precursor de poliproteína, o RNA viral pode ser replicado, a partir da porção 5', em um RNA intermediário de cadeia negativa, o qual é então transcrito em fita positiva (Figura 5) (GUZMAN et al., 2016).

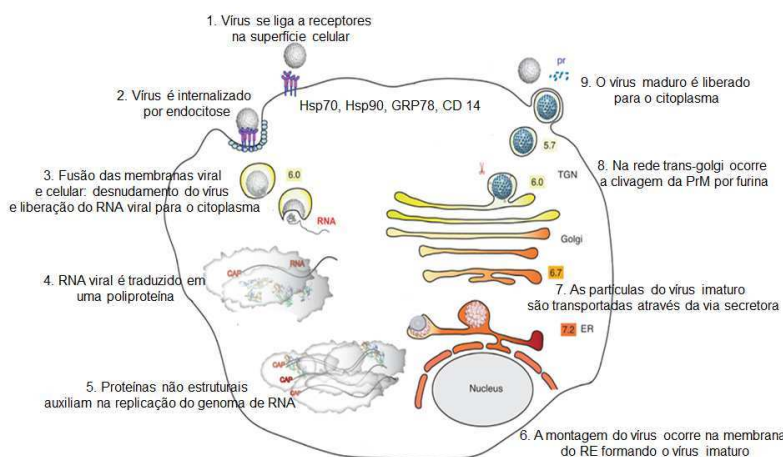


Figura 5: Ciclo de multiplicação dos flavivírus. (A) Vírus adsorvem a receptores na superfície celular e são internalizados por endocitose. (B) No pH baixo do endossomo formado, ocorre a fusão das membranas viral e celular, permitindo o desnudamento do vírus e liberação de RNA para o citoplasma. (C) O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada pelas proteases virais e celulares. (D) As proteínas não estruturais virais auxiliam na replicação do genoma de RNA. (E) A montagem do vírus ocorre na membrana do retículo endoplasmático (RE), onde a proteína do capsídeo e o RNA viral são envolvidos pela membrana do RE e glicoproteínas para formar partículas de vírus imaturo. (F) As partículas de vírus imaturo são transportadas através da via secretora. No pH baixo da rede transGolgi (TGN) ocorre a clivagem de prM mediada por furina. (G) O vírus maduro é liberado para o citoplasma. Os números indicados nas caixas coloridas referem-se ao pH dos respectivos compartimentos (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2011).

A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (RE) conduzindo à formação de partículas imaturas não infecciosas que são transportadas através da via exocítica da célula. O pH ácido na rede trans-Golgi (TGN) provoca um rearranjo das proteínas do envelope e a clivagem proteolítica de prM em "pr" e "M" pela protease furina celular. A porção peptídica "pr" continua associada à partícula para evitar que a proteína E sofra uma fusão prematura antes de ser liberada, havendo então a liberação, em pH neutro da porção "pr" após o brotamento da partícula viral. Finalmente, as partículas virais maduras e as proteínas pr clivadas são transportadas e liberadas no meio extracelular por exocitose (LINDENBACH, B.D., C.L. MURRAY, H.-J. THIEL, 2013).

1.2.6. Sorotipos do DENV

São conhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos de DENV, os quais compartilham uma identidade limitada (aproximadamente 60-75%) na sequência de aminoácidos. O sorotipo 1 é composto pelos genótipos da Ásia, América / África, Tailândia e Pacífico Sul e Malásia. O sorotipo 2 inclui os genótipos Ásia I, Ásia II, Cosmopolitan, América/Ásia e América. O sorotipo 3 é constituído pelos genótipos I, II, III, IV e V. Finalmente, o sorotipo 4 é composto pelos genótipos I, IIa, IIb e III (CHEN; VASILAKIS, 2011).

1.3. Transmissão e epidemiologia da doença

A dengue é uma doença sistêmica aguda que se manifesta com início abrupto, apresentando-se inicialmente com sinais prodrômicos, os quais tornam difícil distingui-la clinicamente de outras infecções. Febre, dor de cabeça, mal-estar, mialgia, dor retro-orbital são sintomas comuns em adultos, sendo que as características clínicas diferem por faixa etária, sendo sintomas como tosse, vômitos e dor abdominal mais comuns em crianças. Leucopenia e trombocitopenia são achados laboratoriais comuns. Na maioria dos casos, a

febre e os sintomas se resolvem sem intercorrências após 3-7 dias e sem sequelas de longo prazo. Em um subconjunto de casos, uma síndrome transitória de extravasamento vascular se desenvolve após 3-4 dias de doença, a qual, nos casos mais graves, pode levar a um choque hipovolêmico com risco de morte (chamado síndrome de choque de dengue) e/ou hemorragia (WHITEHORN; VAN; SIMMONS, 2014). Alguns relatos da literatura mostram que há perda de peso em pacientes de dengue (HOTCHANDANI, 2014; VASSALLO, 2004). Os sintomas da doença geralmente se iniciam entre 4-7 dias após a picada pelo mosquito do gênero *Aedes* e normalmente duram de 3-10 dias (MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013).

Os quatro sorotipos de DENV se originaram em macacos e infectaram independentemente humanos na África e no Sudeste da Ásia entre 100 e 800 anos atrás. Uma hipótese para a disseminação mundial do DENV foi que na Segunda Guerra Mundial, através do transporte de cargas pelo mundo houve adicional transporte acidental de mosquitos infectados. Em 2013, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou que 2,5 bilhões de pessoas, ou seja, 40% da população mundial vivem em áreas com risco para transmissão de dengue (Figura 6). Em 2014 a OMS estimou que 50 a 10 milhões de infecções ocorrem anualmente, incluindo 500.000 casos de Febre Hemorrágica de Dengue – DHF – e 22 mil mortes, a maioria em crianças (<https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html> . Acesso em 01-11-2016).

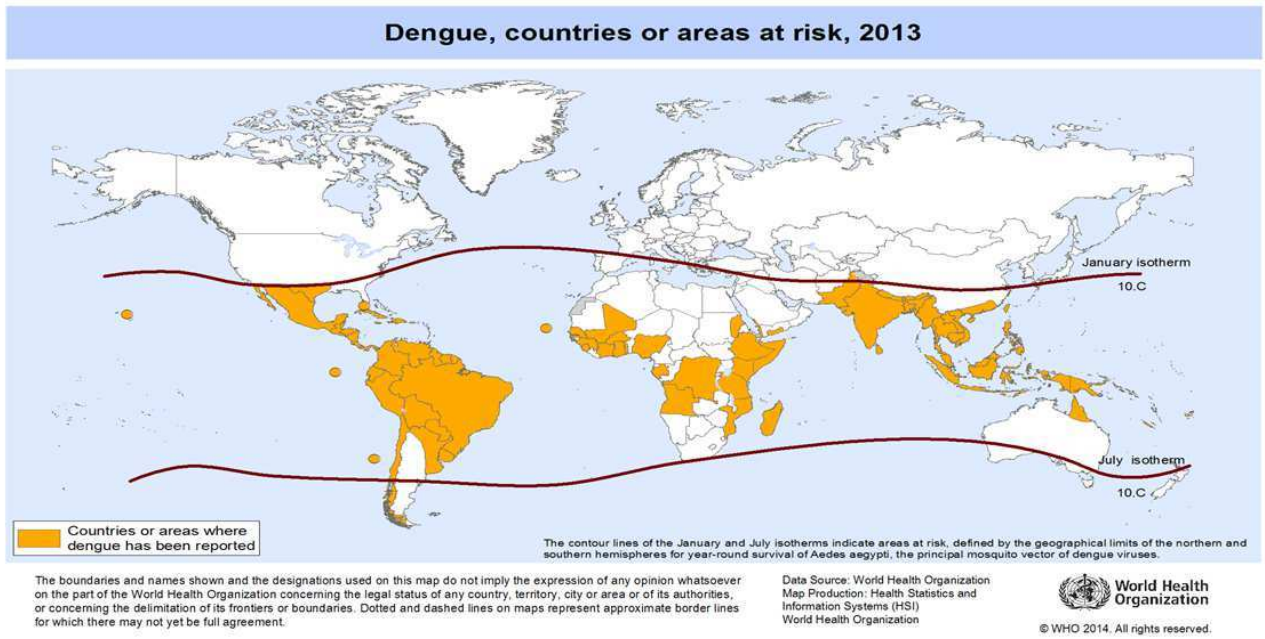


Figura 6: Países e áreas de risco para Dengue (WHO- 2014).

http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png. Acesso em 01-11-2016 (MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013)

Já em 2016 os dados foram atualizados pelas OMS, segundo mapa já citado na Figura 1. Estas são estimativas oficiais, mas o número real de casos de dengue está subnotificado e muitos casos são mal classificados. Uma estimativa de 2013 indicou que 390 milhões de infecções por dengue ocorrem todos os anos (sendo 95% intervalo aceitável entre 284-528 milhões), dos quais 96 milhões (67-136 milhões) se manifestam clinicamente (com qualquer gravidade da doença) (<http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/> Acesso em 15-01-2018).

1.4. Manifestações clínicas da Dengue

Após a infecção do homem através da picada do mosquito *Aedes aegypti*, a infecção pode se apresentar nas formas assintomática ou sintomática. O período de incubação costuma ser de quatro a sete dias, embora possa variar de dois até 15 dias. Além disso, há registro frequente de casos de comprometimento do sistema nervoso central (SNC), comprometimento hepático, esplênico e miocardiopatia. De acordo com a Organização Mundial de Saúde a dengue pode ser classificada como dengue com ou sem sinais de alarme, podendo evoluir para dengue grave. Em 2009, a OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2009) publicou novas diretrizes para o diagnóstico, tratamento, prevenção e controle da dengue, que inclui uma definição de caso de dengue revisada. Nestas diretrizes, um provável caso de dengue foi definido como febre e dois dos seguintes critérios: náuseas/vômitos, erupções cutâneas, dores generalizadas, teste de torniquete positivo, leucopenia e qualquer sinal de alarme (dor abdominal ou tendência, vômito persistente, acúmulo de líquido, hemorragia da mucosa, letargia/agitação, aumento do fígado maior que 2 cm, ou aumento no hematócrito concomitante com diminuição rápida na contagem de plaquetas (GUTIÉRREZ et al., 2013) (Figura 7).

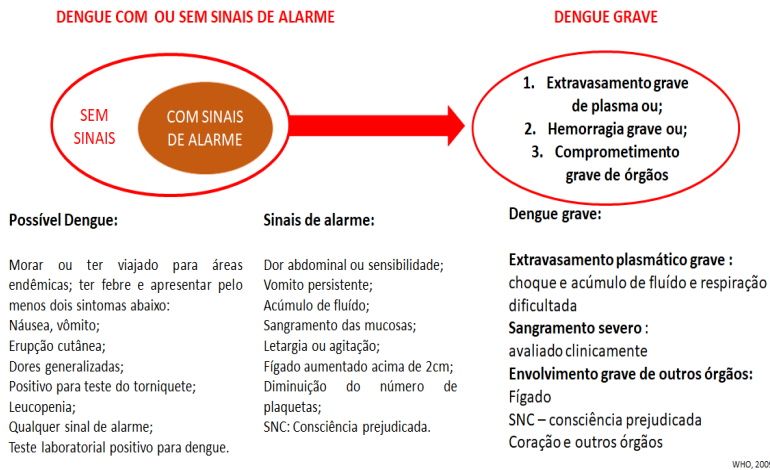


Figura 7: Critérios de diferenciação da Dengue com ou sem sinais de alarme e Dengue grave. Os critérios comuns são: pacientes que estiveram recentemente em áreas endêmicas e que tiveram febre, náuseas ou vômitos, erupções cutâneas, dores, forem positivos para o teste do torniquete, apresentarem leucopenia ou qualquer sinal de alarme. Engloba também os pacientes com confirmação laboratorial positiva para DENV. Na Dengue com sinais de alarme devem ser observados os seguintes sintomas: dor abdominal; vômito constante; acúmulo de fluido; sangramento das mucosas; letargia ou agitação; aumento do fígado acima de 2 cm; aumento do hematócrito acompanhado pela diminuição do número de plaquetas; CNS: consciência prejudicada (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2009).

Os seguintes critérios são observados na evolução para o quadro de dengue grave: extravasamento grave de plasma levando à síndrome do choque da dengue e acumulação de fluido, resultando em dificuldade respiratória; hemorragia grave; envolvimento de órgãos vitais como o fígado, coração e outros; alterações neurológicas; diminuição da consciência (GUTIÉRREZ et al., 2013).

1.5. Patogênese e resposta imune

Durante mais de duas décadas, as pesquisas para identificar os mecanismos subjacentes ao início súbito da permeabilidade vascular e da hemorragia concentraram-se no papel da resposta imune das células T. As pesquisas têm sido centradas quase que exclusivamente em infecções

secundárias de dengue, ignorando assim os importantes subgrupos imunológicos - casos de DH em lactentes - que acompanham infecções primárias de dengue (HALSTEAD, 2007).

Durante infecções secundárias de dengue, altas concentrações de IFN- α são registradas 1-2 dias após o início da febre. No final do período febril e coincidente com o início da permeabilidade vascular, são observadas altas concentrações de receptor de interleucina 2, células T CD4⁺, células T CD8⁺, interleucina 2 e IFN- γ . Além disso, TNF, CD8, receptores de interleucina 2 (IL-2), interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral α (TNF- α), circulante detectável e fator de inibição de migração de macrófagos estão todos correlacionados com a gravidade da doença (HALSTEAD, 2007).

Uma tendência crescente tem sido atribuir a doença grave da dengue à imunopatologia das células T. Os chamados resultados patológicos são postulados quando uma infecção por dengue gera respostas de células T a seqüências heterogêneas antigênicas de dengue (SIMMONS et al., 2005).

O acometimento de SNC pode acontecer durante a infecção aguda ou como uma manifestação pós infecciosa, que parece ser a mais frequente. Na vigência de um quadro agudo de dengue, devemos pensar em acometimento do SNC diante de casos cursando com cefaléia intensa, vômitos, convulsão / delírio, insônia, inquietação, irritabilidade e depressão, acompanhados ou não de meningismo discreto sem alteração da consciência ou deficiência neurológica focal, depressão sensorial e desordens comportamentais (ESTADO et al., 2013).

1.5.1. Receptores do tipo Toll e a resposta imune

A descoberta dos receptores tipo Toll (TLRs) em meados dos anos 90 mostraram que o reconhecimento pelo sistema imune inato é específico (KAWAI; AKIRA, 2010).

Os receptores do tipo Toll são sentinelas do sistema imune e atuam de forma relevante na sinalização de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como DNA de cadeia dupla não metilado (CpG), RNA de fita simples (ssRNA), lipoproteínas, lipopolissacarídeos (LPS), e flagelinas (AKIRA, 2003).

Nos vertebrados, a família dos TLRs incluem de 10 a 13 proteínas (TLR 1- TLR13). Recentemente, dois novos TLRs (TLR 12 e TLR13) foram descobertos em células de murinos, mas ainda pouco se sabe sobre eles. Os TLRs possuem uma porção extracelular contendo várias repetições de leucina, uma região trans-membrana e uma cauda citoplasmática chamada de TIR (TOLL-IL-1R: receptor de interleucina 1) (ALERTS, 2014).

Nas células imunes mielóides inatas, os TLRs induzem a secreção de citocinas inflamatórias, acoplando assim os linfócitos para montar uma resposta imune antígeno-específica para, em última instância, eliminar microrganismos invasores (AKIRA, 2003).

Diferentes tipos de TLRs servem de receptores para diferentes ligantes incluindo componentes da parede celular bacteriana, vírus de RNA de fita dupla e de fita simples, pequenas moléculas anti-virais ou componentes imunomoduladores (Tabela 2) (ALERTS, 2014).

Tabela 2: PAMPs e PRRs e seus respectivos TLRs (ALERTS, 2014) modificado.

PAMP	PRR	PATÓGENO
Pam3CSK4, PGN, Zymosan	TLR 1, 2 e 6	Bactéria Gram positiva (ex. S aureus)
LPS, lipídeo A	TLR4	Bactéria Gram negativa (ex. E Coli)
Flagelinas	TLR5	Bactérias flageladas
RNA fita dupla	TLR3	Vírus
RNA fita simples	TLR7, 8	Vírus
DNA CpG	TLR9	Bactéria, DNA, parasitas protozoários

Os TLR3, 7, 8 e 9 são encontrados na membrana dos endossomos, onde eles respondem principalmente a PAMPs de microrganismos.

O TLR3 ativa células em resposta a RNA viral de fita dupla. A estimulação do TLR3 desencadeia a ativação de TRIF que, em última instância, ativa o fator de transcrição IRF3 (interferon regulatório do fator 3) através de TBK1 (serine/threonine-proteína quinase), independente de MyD88. Isso leva a secreção de IFN β . O TRIF (também ativa RIP1 (proteína 1 interação/receptor) e TRAF6 (receptor de TNF associado ao fator 6), que pode ainda ativar a via NF-kB (fator nuclear kappa B) (GREEN et al., 2015).

Pequenos compostos anti-virais ativam as células pela via de sinalização TLR7/MyD88-dependente. O TLR7 se liga ao MyD88 (fator de diferenciação mielóide fator 88) e ativa IRAK (quinase associada ao receptor de IL-1) e TRAF6. TRAF6 então ativa TANK (também conhecido como I-TRAF – fatores associados ao receptor de TNF). TANK interage com TBK1 e IKK- ϵ (serina quinasequinase IKK epsilon) para activar IRF3. TLR7 ou TLR8 podem também ativar IRF7 através da interação de MyD88, BTK (tirosina kinas de Bruton) e TRAF6, induzindo assim respostas anti-virais produzindo IFN α . Outras células usam RIG1-like e RLHs (RIG like helicases) para reconhecer PAMPs virais resultando principalmente em uma resposta de IFNs (GREEN et al., 2015).

O fato das células dendríticas plasmacitóides utilizarem TLRs sugere que a resposta dependente de TLR à infecção viral é importante para a proteção viral imediata, bem como a ativação da imunidade adaptativa através das citocinas inflamatórias (GREEN et al., 2014).

O dengue vírus infecta principalmente células imunes de linhagem mielóide, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, e possivelmente hepatócitos e células endoteliais (GREEN et al., 2014).

Na Figura 7 podemos ver um exemplo simplificado da via de entrada do DENV na célula hospedeira (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015b).

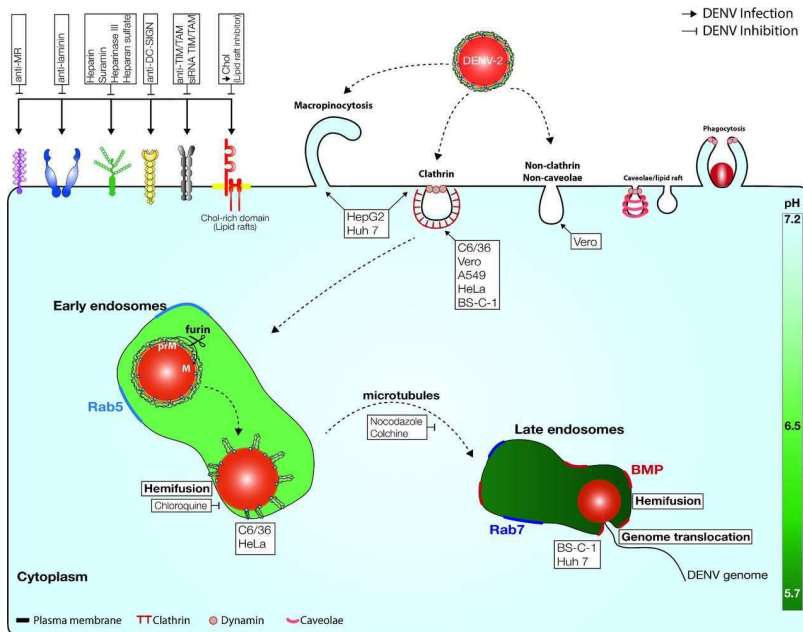
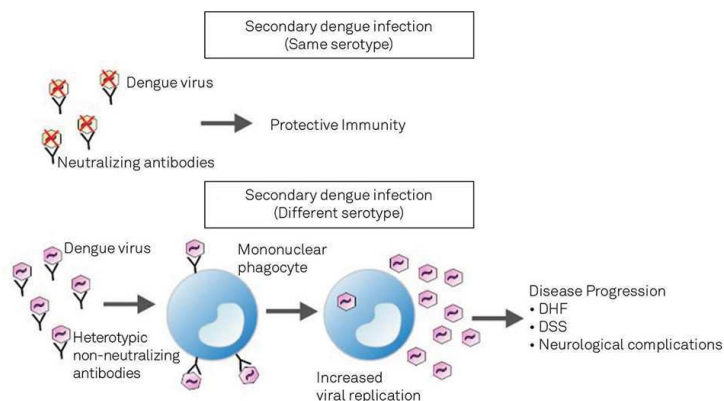


Figura 8: Exemplo de via de entrada do DENV em suas células hospedeiras (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015b) modificado.

O DENV se liga à superfície da célula hospedeira através de diferentes receptores. A partícula viral é internalizada através de vias distintas que incluem endocitose mediada por clatrina, endocitose independente de clatrina não-clássica ou macropinocitose, dependendo do hospedeiro e do sorotipo do vírus. Durante o tráfico endocítico, o pH do meio endossomal é acidificado provocando alterações conformacionais da proteína E, que induzem a hemifusão entre a membrana endossomal e a membrana do vírus. Dependendo do tipo de célula, a fusão do vírus ocorre em endossomas precoces ou tardios. A TGN (trans-Golgi) protease furina também pode estar localizada em endossomas precoces onde pode promover a maturação de partículas virais imaturas pela clivagem da prM. Em alguns casos, a despolimerização de microtúbulos inibe a liberação da fusão e / ou do genoma no citoplasma. Sugerindo que o tráfico do vírus em endossomas precoces para tardios envolve o transporte através de vesículas intraluminais (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015b).

1.5.2. ADE - Antibody-dependent enhancement (Facilitação dependente de Anticorpos)

Este fenômeno ocorre quando proteínas antivirais não neutralizantes facilitam a entrada do vírus nas células hospedeiras, levando a infectividade aumentada nas células. Algumas células não têm os receptores habituais em suas superfícies que os vírus usam para entrar na célula. As proteínas antivirais (anticorpos) ligam-se a receptores Fc do anticorpo, que algumas destas células têm na membrana plasmática (DIMMOCK et al. 2014). O vírus da Dengue pode usar esse mecanismo para infectar macrófagos humanos, causando uma infecção viral, que normalmente seria leve, tornar-se com risco de vida (Figura 9) (PUCCIONI-SOHLER; ROSADAS, 2015).



DENV: dengue virus; DHF: dengue severe hemorrhagic syndrome; DSS: dengue severe shock syndrome.

Figura 9: ADE na infecção por DENV. (PUCCIONI-SOHLER; ROSADAS, 2015) adaptado.

O fenômeno do ADE pode ser observado quando uma pessoa que foi previamente infectada com um sorotipo de DENV torna-se infectada muitos meses ou anos mais tarde com um sorotipo diferente. Em tais casos, o curso clínico da doença é mais grave, e essas pessoas têm maior viremia em

comparação com aqueles em que ADE não ocorreu (GUZMAN; VAZQUEZ, 2010).

A infecção com DENV induz a produção de anticorpos homotípicos neutralizantes de imunoglobulina G (IgG) que proporcionam imunidade ao longo da vida contra o sorotipo infectante. A infecção com DENV também produz algum grau de imunidade de protecção cruzada contra os outros três sorotipos. Os anticorpos de IgG heterotípicos neutralizantes (reativos cruzados) são responsáveis por esta imunidade de protecção cruzada, que tipicamente persiste durante um período de vários meses a alguns anos (GUZMAN et al., 2007).

Enquanto os títulos de anticorpos IgG heterotípicos diminuem, os títulos de anticorpos IgG homotípicos aumentam durante longos períodos de tempo. Isto pode ser devido à sobrevivência preferencial de células B de memória de longa duração que produzem anticorpos homotípicos (GUZMAN et al., 2007).

Além de induzir anticorpos heterotípicos neutralizantes, a infecção com DENV também pode induzir anticorpos heterotípicos que não neutralizam o vírus. A produção de tais anticorpos de reacção cruzada, mas não neutralizantes, poderia ser a razão para infecções secundárias mais graves (GONCALVEZ et al., 2007).

1.6. Modelo animal para estudo de infecção por DENV

O desenvolvimento de um modelo animal capaz de reproduzir de forma fiel a patologia observada em seres humanos tem sido um grande desafio, haja vista que somente os seres humanos desenvolvem as formas graves da doença, não havendo sequer uma espécie de primata não humano que desenvolva os sinais clínicos da dengue observados em seres humanos. Embora vários modelos murinos tenham sido descritos, nenhum foi capaz de recriar, de maneira eficaz, todos os sintomas causados por infecção por DENV (Tabela 3) (BENTE; RICO-HESSE, 2006).

A dificuldade em desenvolver um modelo murino eficiente para o estudo da patogênese causada por DENV ocorre devido à incapacidade das

amostras de DENV isoladas a partir de espécimes clínicos isolados se multiplicarem de forma eficaz nos camundongos. Embora uma variedade de modelos murinos tenham sido desenvolvidos, a maioria não é ideal para investigar mecanismos da patogênese. Os modelos já testados e utilizados incluem infecção intracraniana (IC), camundongos quiméricos transplantados com células humanas e camundongos imunocomprometidos (YAUCH; SHRESTA, 2008).

A Tabela 3 (YAUCH; SHRESTA, 2008) cita alguns dos principais modelos de inoculação por DENV já estudados. Sobretudo, nenhum modelo murino foi capaz de recriar todo o espectro da doença (FD e DHF / DSS).

Tabela 3: Diferentes modelos murinos de infecção com DENV (YOUCH & SHRESTA, 2008 - modificado).

Camundongo	DENV/Inoculação	Características/ Sintomas	Referência
Camundongos-humanos quimeras			
SCID-hu-H7 (reconstituídos com células hu-H7- derivadas de hepatócitos humanos)	DENV-4 10 ⁷ ufp i.t.	Vírus no soro, cérebro, fígado	Blaney et al. 2002
NOD ^g /SCID-humanCD34 (reconstituídos com células CD34- derivadas de células progenitoras hematopoiéticas humanas)	DENV-2 10 ⁴⁻⁷ ufp s.c.	Vírus no soro, fígado, pele, febre e trombocitopenia	Bente et al. 2005
RAG2 ^{fl} /γc ^{fl} - humanCD34 (reconstituídos com células CD34- derivadas de células progenitoras hematopoiéticas humanas)	DENV-2 10 ⁶ ufp s.c.	Vírus no soro, febre e resposta de anticorpo humano	Kuruvilla et al. 2007
Imunodeficientes			
AG129 Sv/Ev (deficientes em receptores de Ifna, b, g)	DENV-2 (PL046) 10 ⁷ ufp i.v.	Extravasamento vascular e morte rápida mediada por TNF-α	Shresta, 2006
AG129 Sv/Ev (deficientes em receptores de Ifna, b, g)	DENV-2 (D2S10) 10 ⁷ ufp i.v.	Vírus no soro, trombocitopenia e paraplegia temporária	Shresta, 2006
STAT ¹ / (deficientes na proteína sinalizadora STAT)	DENV-2 10 ⁶ ufp i.p./i.c.	SC hemorragia, trombocitopenia e hemorragia sistêmica	Chen et al. 2008
Imunocompetentes			
A/J (mutação natural no gene que leva a distrofia muscular progressiva)	DENV-2 10 ⁶ ufp i.v.	Hematócrito elevado e diminuição Leucocitária	Huang, 2000
C57BL/6	DENV-2 1-3x10 ⁶ ufp, i.d., i.p.	Dano ao fígado	Chen et al. 2004
A/J	DENV-2 10 ⁶ ufp i.v.	SC hemorragia intestinal, extravasamento vascular e paralisia	Shresta, 2004a
BALB/c	DENV-2 10 ⁴ TCID ₅₀ i.p.	Dano ao fígado	Paes et al. 2005
C57BL/6 e BALB/c	DENV-3 1x10 ³ ufp i.p.	Anemia, trombocitopenia, paralisia e choque	Costa et al. 2012

*SCID-Camundongos com imunodeficiência combinada grave: não possuem linfócitos maduros e funcionais. #Camundongos com diabetes autoimune. ^gCamundongos deficientes na produção de linfócitos T e B maduros e receptores de Ifnb. i.c.:intracraniana; i.t.:intratumoral; i.d.:intradérmica; i.v.:intravenosa; i.p.:intraperitoneal; s.c.:subcutânea. ufp:unidades formadoras de placa.

Conforme citado na tabela acima, vários modelos murinos, utilizando camundongos imunocompetentes, camundongos nocautes e camundongos humanizados já foram descritos na literatura para o estudo da infecção por DENV. De acordo com o objetivo do nosso trabalho, vamos nos ater aos modelos que utilizaram camundongos imunocompetentes para o estudo da dengue.

O uso de camundongos imunocompetentes é ideal para compreender o perfil das respostas imunes do hospedeiro, bem como a imunopatogênese da doença. Embora os camundongos imunocompetentes sejam naturalmente resistentes ao DENV, a infecção pode ser estabelecida com elevados inóculos de vírus. Estes estudos (tabela 2) apoiam o uso de camundongos imunocompetentes nos estudos para uma melhor compreensão de patogênese por DENV, e possivelmente auxiliam no melhor entendimento do papel das respostas em manifestações graves de dengue (CHAN et al., 2015).

Estudos de Chen e colaboradores (2007), demonstraram o desenvolvimento de hemorragia localizada (uma característica relevante da DHF/DSS) nos tecidos subcutâneos de camundongos imunocompetentes infectados com DENV2, acompanhados de trombocitopenia grave e carga viral detectável no soro, baço, fígado, pele e cérebro, demonstrando assim a eficácia do inóculo de DENV em camundongos imunocompetentes e gerando resultados relevantes para o estudo da patologia utilizando estes animais. Este estudo também demonstrou que macrófagos, após a infecção por DENV, induzem a produção de TNF- α que correlaciona-se fortemente com a hemorragia, uma vez que o camundongo nocaute para TNF- α apresentou uma diminuição da incidência de hemorragia, indicando um potencial papel da imunidade inata na imunopatologia da doença grave (CHEN et al., 2007).

St John e colegas, em 2013, demonstraram a contribuição da ativação de mastócitos induzida por DENV e liberação de mediadores no desencadeamento do extravasamento vascular também utilizando camundongos imunocompetentes (ST JOHN et al., 2013).

Em conjunto, estudos utilizando camundongos imunocompetentes apresentam um modelo promissor para investigar a contribuição do sistema imune e a resposta à patogênese e, possivelmente, ser utilizado para avaliação de vacinas pré-clínicas (CHAN et al., 2015).

Assim, é possível perceber que diferentes modelos murinos devem ser usados para diferentes tipos de estudo sobre a patologia do dengue, sendo a utilização de camundongos imunocompetentes crucial para o melhor entendimento da resposta imune frente à infecção por DENV.

2. JUSTIFICATIVA

Vários aspectos na dengue são ainda desconhecidos, dentre os quais, aqueles relacionados à patogênese e à resposta imune do hospedeiro. Neste sentido, a utilização do modelo experimental murino é de grande importância para a elucidação de mecanismos imunológicos desencadeados durante a infecção, compreendendo tanto a imunopatogênese da dengue, quanto o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Há alguns anos, nosso grupo de pesquisa isolou um vírus DENV-3 genótipo I (FERREIRA et al., 2010; DE SOUZA et al., 2013; CAMPOS et al., 2016) de um paciente que foi diagnosticado com dengue grave. Esse vírus se mostrou altamente virulento em camundongos quando inoculado pela via intracraniana, sem que houvesse adaptação prévia deste vírus, nesses animais. Desta forma, esse vírus tem sido utilizado em diferentes estudos do nosso grupo, visando à melhor caracterização e compreensão da imunopatologia e neurovirulência durante a infecção pelo vírus da dengue.

Nosso grupo já demonstrou que esse isolado altamente virulento é detectável em diferentes órgãos de camundongos infectados, induzindo níveis mais elevados de produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, incluindo NOS2, que seria um dos fatores responsáveis pela imunopatologia (DE SOUZA et al., 2013).

Desta forma, a infecção intracraniana em camundongos infectados com DENV altamente virulento, conhecido por provocar doenças do SNC humano, é um modelo para estudar a resposta imune, manifestações neurológicas e imunopatológicas (CAMPOS et al., 2016). No entanto é uma forma agressiva e artificial de inóculo, uma vez que a infecção natural não ocorre pela via intracraniana.

A associação entre duas vias de infecção é uma possibilidade de estudo visando uma melhor compreensão de mecanismos que possibilitam a proteção a uma segunda infecção do mesmo vírus, sendo estudada no modelo de infecção subcutâneo e intracraniano.

O modelo de infecção subcutânea é ainda pouco explorado para o estudo do DENV, sendo um modelo promissor visando um maior entendimento da resposta imune ao longo da infecção subcutânea em murinos, uma vez que

este modelo de infecção se aproxima do que acontece na natureza (mosquito picando pele do homem).

Em virtude do que foi citado acima, nosso estudo mostra-se relevante para auxiliar a melhor compreensão da resposta imune frente à infecção por DENV, permitindo a melhor compreensão do intrincado mecanismo imunológico desencadeado após a infecção pelo vírus da dengue e o seu impacto na patogênese e mortalidade dos animais infectados. Finalmente, a compreensão desses mecanismos, pode contribuir para o racional do desenvolvimento de novos fármacos e vacinas, capazes de tratar ou prevenir a infecção pelo vírus da dengue. Sendo assim, gostaríamos de avaliar a efetividade do uso de um modelo murino para o estudo da dengue, em que camundongos imunologicamente competentes são inoculados com um vírus da dengue altamente virulento, por via subcutânea.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar um modelo murino para o estudo da dengue, em que camundongos imunologicamente competentes são inoculados com um vírus da dengue altamente virulento, por via subcutânea.

3.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar e comparar a sobrevivência e possível perda de peso de camundongos C57BL/6 infectados com DENV3 genótipo I, altamente virulento, comparando os resultados obtidos em inoculo intracraniano com inoculo subcutâneo e inoculo subcutâneo seguido de intracraniano.
2. Caracterizar as alterações hematológicas nos animais infectados com DENV por via subcutânea.
3. Avaliar a produção de diferentes citocinas no baço e fígado de camundongos C57BL/6 infectados com DENV por via SC.
4. Avaliar um outro modelo de infecção subcutânea utilizando mosquitos *A. aegypti* infectados com DENV.
5. Avaliar a produção de óxido nítrico por macrófagos murinos estimulados com amostra de DENV altamente virulento.
6. Estudar o modelo de infecção subcutânea seguida de infecção intracraniana, verificando o peso após infecção IC, a expressão de moléculas e citocinas e verificando a produção de citocinas.

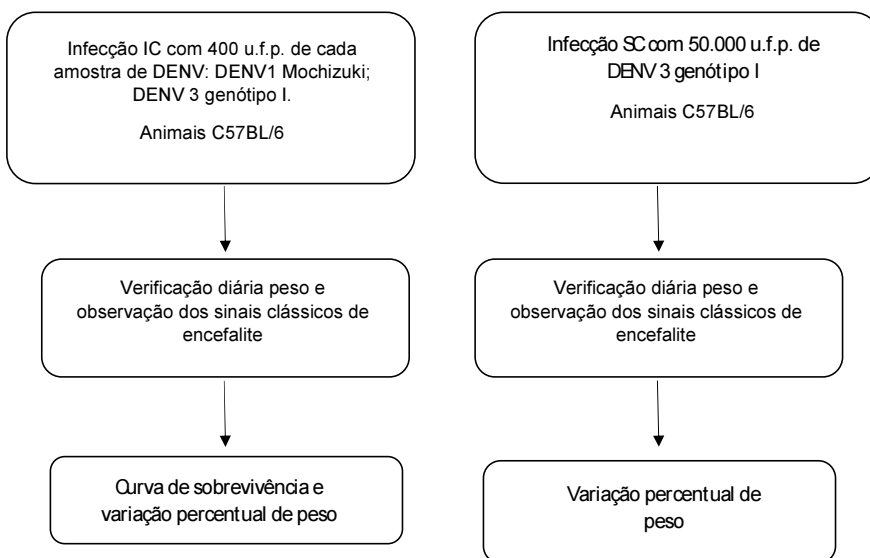
4. METODOLOGIA

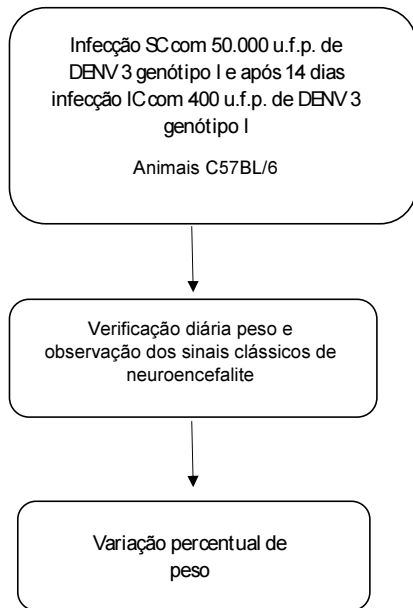
4.1. Estratégias de trabalho

As estratégias de trabalho citadas a seguir se basearam em cada etapa de trabalho desenvolvida, visando alcançar os objetivos específicos propostos no trabalho, para que fosse possível a conclusão do mesmo. A ordem dos grupos experimentais de trabalho segue a ordem explicitada nos objetivos e resultados deste trabalho. Para todos os grupos trabalhados foram utilizados o n de 6 animais por grupo.

4.1.1. Curva de sobrevivência e variação percentual de peso de camundongos infectados com DENV por via intracraniana (IC), subcutânea (SC) e subcutânea-intracraniana (SC-IC)

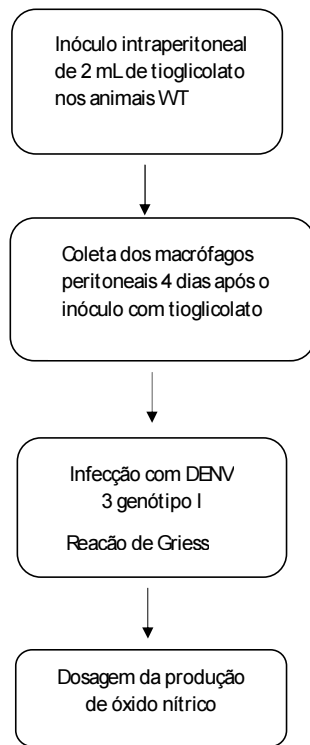
Grupo experimental 1:





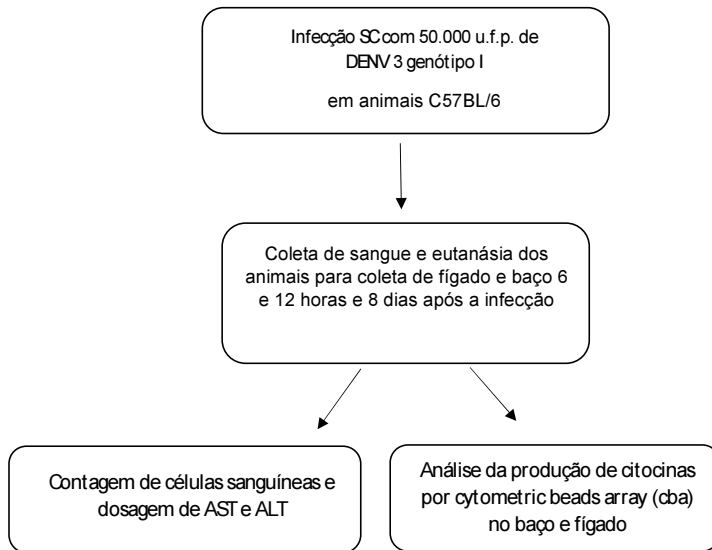
4.1.2. Produção de Óxido Nítrico

Grupo experimental 2:



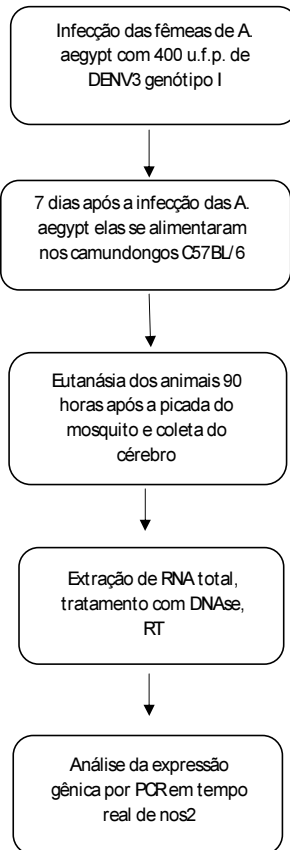
4.1.3. Infecção subcutânea com DENV 3 genótipo I, em camundongos C57BL/6

Grupo experimental 3:



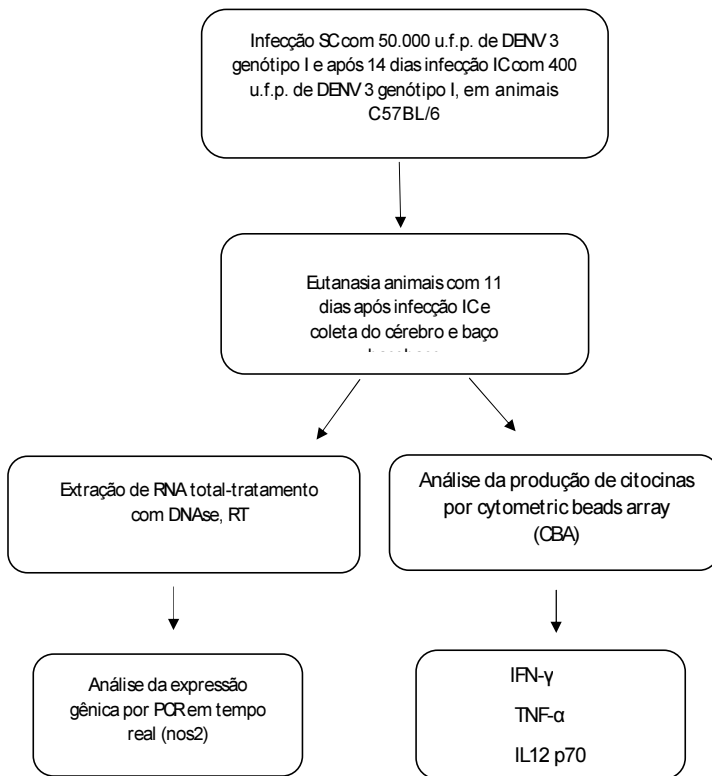
4.1.4. Infecção experimental de camundongos com mosquitos *Aedes aegypti* infectados com DENV 3 genótipo I

Grupo experimental 4:



4.1.5. Infecção subcutânea e posterior infecção IC com DENV 3 genótipo I, em camundongos C57BL/6

Grupo experimental 5:



4.2. Cultivo celular

4.2.1. Células C6/36

As células C6/36 de linhagem contínua de larvas de mosquito *Aedes albopictus*, foram utilizadas para a preparação dos estoques virais. Resumidamente, essas células foram cultivadas em meio Leibovitz (L-15) (Gibco, USA), contendo 10 µg/mL de ciprofloxacino e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), em estufa tipo B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 28°C. Para os repiques das culturas celulares, o meio de cultivo foi desprezado e as células lavadas com PBS (tampão fosfato salina - NaCl 137 mM; KCl 7 mM; Na₂HPO₄ 1,4 mM; pH 7,2). Em seguida, as células foram homogeneizadas em meio de cultivo celular Leibovitz (L-15) (Gibco, USA) e distribuídas em garrafas de 25 ou 75 cm² (SARSTEDT- Alemanha).

4.2.2. Células BHK-21

Células BHK-21, as quais são derivadas de rim de hamster, foram utilizadas para a realização do protocolo de titulação viral. Elas foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, USA), contendo 50 µg/mL de gentamicina, 100 UI/mL de penicilina, 5 µg/mL de anfotericina B e 5% de SFB e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C.

4.3. Vírus

As amostras de vírus utilizadas no presente trabalho: DENV-3 genótipo I (MG20) altamente virulento, foram isoladas previamente de pacientes que apresentaram manifestações clínicas da Dengue na região metropolitana de Belo Horizonte, em trabalho anterior (FIGUEIREDO et al., 2008). As amostras de DENV-1 Mochizuki (vírus adaptado) altamente virulento, foram isoladas anteriormente de pacientes infectados com DENV e obtidos da Coleção de vírus do Laboratório de vírus da UFMG.

4.4. Multiplicação viral

Para a produção dos pools estoque e trabalho de DENV, utilizou-se o protocolo adaptado segundo SAKOONWATANYOO; BOONSANAY; SMITH, 2006. Resumidamente, células C6/36 foram infectadas com DENV diluído em meio L-15, utilizando-se uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,1. A adsorção das partículas virais à célula foi realizada durante 1 hora em estufa de BOD (sem atmosfera de CO₂) a 28°C, sendo realizada a homogeneização a cada 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 mL de meio de cultura L-15 e as células infectadas foram incubadas nas condições acima citadas por cerca de seis dias, sendo que observações diárias das monocamadas infectadas foram realizadas, a fim de monitoramento do aparecimento dos sincícios. Quando houve formação de 60% de sincícios na superfície da monocamada, o sobrenadante foi centrifugado a 200g por 15 min, a 4°C. O sobrenadante clarificado foi distribuído em alíquotas de 0,2 mL, as quais foram estocadas a menos 70°C para uso posterior.

4.5. Titulação (Determinação de Unidades Formadoras de Placa – u.f.p.)

As titulações dos estoques virais e dos órgãos dos camundongos infectados com DENV foram realizadas em células BHK-21, segundo o protocolo adaptado de DULBECCO; VOGT, 1953. Resumidamente, 5x10⁵ células BHK-21 foram adicionadas a cada poço de placas de 6 cavidades e cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% de SFB e antibióticos e incubadas durante 24 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂.

Em seguida, o meio de cultura foi desprezado e a monocamada celular foi lavada uma vez com PBS e foram adicionados 400 µL das diluições seriadas do vírus a ser titulado (utilizando as diluições de 10⁻³ a 10⁻⁷) em cada uma das placas. Um dos poços foi reservado para ser utilizado como controle de células, no qual foram adicionados 400 µL de meio de cultura. Durante o período de adsorção (1 hora) a placa foi homogeneizada a cada quinze minutos. Posteriormente, descartou-se a suspensão viral e foram adicionados 2 ml de meio DMEM contendo 2% de carboximetilcelulose (CMC, Sigma) e 2% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) em cada um dos poços das placas de cultura.

Elas foram incubadas a 37°C por 6 dias em estufa com 5% de CO₂ e a cada dia foi observada a evolução da formação dos efeitos citopáticos. As placas foram então fixadas durante 1h com formaldeído a 3,7% em PBS para posterior processo de coloração com solução de cristal violeta a 1% durante 20 minutos. O número de placas de lise foi contado para a determinação do título das amostras. Este título foi expresso pela contagem de placas de lise (no poço no qual foi observado entre 30 e 300 placas de lise), multiplicado pelo inverso da diluição e pelo fator de diluição (2,5 mL), dando o título final em unidades formadoras de placas por mL (u.f.p. /mL).

4.6. Camundongos

Os camundongos machos da linhagem C57BL/6 com idades variando entre 6 e 8 semanas de idade foram fornecidos pelo biotério do IRR. Os animais foram mantidos em micro-isoladores e em estantes ventiladas no Biotério de Experimentação do IRR, em condições de temperatura (entre 23°C +/- 2°C), umidade, ventilação, higienização e iluminação controladas. Alimentação e água foram fornecidos ad libitum. Todas as gaiolas, maravalha, ração e água colocados para os animais foram previamente autoclavados e os animais foram transferidos em cabine de segurança biológica, dentro do próprio biotério de experimentação do IRR. Foram utilizados 6 animais por grupo em cada experimento realizado.

Para o melhor cuidado dos animais (enriquecimento ambiental), todas as gaiolas dos animais foram equipadas com iglus para diminuir o nível de estresse dos camundongos ao longo do experimento.

A eutanásia dos animais foi feita por deslocamento cervical nos dias de coleta dos órgãos. Para o procedimento de coleta, após a eutanásia, os órgãos (fígado, baço e cérebro) foram retirados e divididos em três partes. A primeira foi utilizada para a extração de RNA. A segunda foi utilizada para a titulação viral e a terceira, para os experimentos de CBA. A parte do órgão destinada à extração de RNA foi armazenada em 0,25 mL de Trizol. A porção destinada à titulação foi conservada em 0,5mL de PBS e aquela a ser utilizada nos experimentos de CBA foi armazenada em 0,5mL de solução contendo inibidores de protease. Todas as amostras foram estocadas a 70°C negativos.

4.7. Comitê de Ética

As licenças para o desenvolvimento deste projeto, 26/11 da UFMG (maio de 2011 a maio de 2016), e a licença LW-7/16 (fevereiro de 2016 a fevereiro de 2020), foram obtidas do CETEA/UFMG e do CEUA/ Fiocruz, respectivamente (cópia dos documentos em anexo).

4.8. Anestesia

Os camundongos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg) + cloridrato de xilazina (10 mg /kg) (dose obtida no Manual de Normas Técnicas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 2004), pela via intraperitoneal, no quadrante lateral inferior direito, com volume máximo de 40 μ l.

4.9. Infecção intracraniana murina (IC) com DENV

A infecção IC foi feita com agulha 8,0 x 0,3 mm e seringa BD Ultra-fine II de 50 UI ou 0,5 mL. O inóculo foi realizado no quadrante esquerdo e posterior do cérebro do camundongo (Figura 10).

A infecção IC nos animais C57BL/6 foi feita com 4×10^2 u.f.p. de dois diferentes sorotipos de DENV: DENV-3 genótipo I (MG20) altamente virulento e DENV-1 altamente virulento, (Mochizuki), em volume final de 10 μ l. Os animais do grupo controle foram inoculados com o sobrenadante de células C6/36 não infectadas (mock).

Infecção Intracraniana (IC)

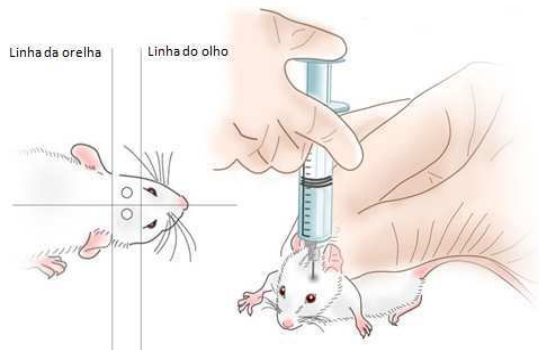


Figura 10: Ilustração da infecção intracraniana em camundongos. Adaptado: <http://www.clodrosome.com/routes-of-administration/intracerebral-injection/>. Acesso em 16/06/2015.

4.10. Infecção subcutânea murina (SC) com DENV

Os animais C57BL/6 receberam o inóculo de 5×10^4 u.f.p. de DENV 3 genótipo I (MG 20) - 6ª passagem em 100 μ l, pela via subcutânea. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de inóculo, constituído do sobrenadante de células C636 não infectadas (mock).

A injeção foi aplicada no dorso do animal, conforme Figura 11.



Figura 11: Imagem inóculo subcutâneo. <http://www.petshoprj.com.br/blog/uso-de-animais-para-ensino-e-pesquisa-em-questao/>. Acesso em 20-08-2016.

4.11. Infecção experimental de camundongos com picadas de mosquitos *Aedes aegypti* infectados com DENV 3 genótipo I

Fêmeas de mosquitos *Aedes aegypti* com 4-7 dias de idade, cedidas pelo doutor Eric Caragata (Laboratório do grupo de pesquisa Mosquitos Vetores Endossimbiontes e Interação Mosquito Vetor do IRR) foram utilizadas neste experimento juntamente com os camundongos C57BL/6.

Na semana anterior ao experimento foram realizadas as nanoinjeções de suspensão viral nas fêmeas de *A. aegypti*. Os insetos foram anestesiados com CO₂ e mantidos em placas de Petri resfriadas com gelo. Para as nanoinjeções utilizou-se o Nanoject II™ Auto-Nanoliter Injector, sob um microscópio estereoscópico. Primeiramente os mosquitos foram individualmente injetados com 69 nL de meio de cultivo Leibovitz 15 (L-15) proveniente do cultivo de células C6/36 grupo controle, ou injetados com 69 nL do DENV3 genótipo I na concentração de $5,3 \times 10^6$ u.f.p./mL, recebendo cada mosquito 365 u.f.p. de vírus. Após a inoculação, as fêmeas foram mantidas alimentando-se apenas de solução de açúcar em água a 10% por uma semana, quando foram colocadas na presença de camundongos, durante 30 minutos, a fim de realizarem o repasto sanguíneo.

Para a realização do experimento, os mosquitos foram removidos das gaiolas das colônias e transferidos para pequenos copos plásticos (500 mL) com tampas e protegidos da luz, em grupos de 15 a 20 fêmeas por recipiente.

As fêmeas de *Aedes* foram divididas em grupos de 15 a 20 e colocadas em um vasilhame circular adequado, fechado e com a tampa coberta por uma malha vazada possibilitando o contato dos mosquitos com um camundongo C57BL/6 previamente anestesiado (cerca de 5 animais por grupo). O ambiente foi mantido na penumbra para facilitar a alimentação pelos mosquitos. A fim de que fosse avaliado o número de fêmeas de *Aedes* que se alimentaram nos camundongos, os mosquitos foram anestesiados com CO₂ e colocados sobre uma placa de Petri sob o gelo. A identificação dos animais que realizaram o repasto sanguíneo foi realizada pela observação do volume do abdômen de cada inseto.

Este experimento foi realizado no Insetário do Laboratório de Mosquitos vetores: Endossimbiontes e Interação Parasito Vetor do IRR, o qual possui

certificação de laboratório de nível 2 de biossegurança. Os camundongos foram eutanasiados 90h após a infecção.

4.12. Extração de RNA

Os órgãos previamente coletados e armazenados em Trizol[®] (250 μ l) foram macerados com auxílio de pistilo e o volume de Trizol[®] foi completado para 1,0 mL. Os órgãos processados foram armazenados em microtubos de 1,5 mL a -70°C.

A extração do RNA foi feita segundo o protocolo indicado pelo fabricante do reagente de TRizol[®] (Invitrogen), com adaptações feitas segundo Bitencourt e colaboradores (BITENCOURT et al., 2011). Resumidamente, o tecido previamente macerado com auxílio de pistilo, foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Foi feita uma centrifugação de 10 minutos a 12.000 g a 4°C para a separação do sedimento do restante da amostra. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde foram adicionados 200 μ l de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada, com auxílio do vortex, e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. A separação das fases foi feita por centrifugação a 12.000 g por 15 min. a 4°C. A fase aquosa (superior, transparente), onde o RNA está presente, foi coletada e transferida para um novo tubo. A precipitação do RNA foi feita com a adição de isopropanol, seguida de centrifugação a 12.000 g por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o RNA homogeneizado em 30 μ l de água livre de RNase (Ultra Pure Distilled Water – Invitrogen). O RNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) a 260nm e armazenado a 70°C negativos.

4.13. Tratamento do RNA com DNase

A fim de evitar possíveis contaminações com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase livre de RNase (Promega, EUA). O protocolo utilizado seguiu as orientações do fabricante (Promega). Resumidamente, foram adicionados 1 μ l de 10x Reaction Buffer e 2 unidades

de DNase livre de RNase (2 μ l) para cada amostra de RNA a ser tratada (1-7 μ l); o volume da reação foi ajustado para 10 μ l e elas foram incubadas a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, inativadas com a adição da DNase Stop Solution (1 μ l) e incubação de 10 minutos a 65°C.

4.14. Transcrição Reversa (RT)

O procedimento de transcrição reversa foi realizado imediatamente após a realização do protocolo de inativação do DNA e feito de acordo com o protocolo do fabricante da enzima M-MLV RT (Promega Corporation, E.U.A.). Para esse fim, 2,0 μ g de RNA de cada amostra foram incubados com 0,5 μ g de iniciador aleatório (Invitrogen, EUA) em água (volume final de 15,0 μ l) por 5 min. a 70°C, seguido do imediato resfriamento em banho de gelo. Simultaneamente, foi preparado um mix com 5,0 μ l do tampão 5X Reaction buffer da enzima M-MLV (Tris-HCl 250mM pH 8,3; KCl 375mM; MgCl₂ 15mM e DTT 50mM), fornecido pelo fabricante, e acrescido de 1,25 μ l de cada dNTP na concentração de 10mM, 200U da enzima M-MLV RT e água livre de RNase para um volume final de 25 μ l. Essa mistura foi adicionada ao restante da reação e incubada a 37°C por 60 min. As amostras foram armazenadas a 20°C negativos até o uso.

4.15. PCR em Tempo Real (qPCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se 2,5 μ l do cDNA obtido a partir da reação de transcrição reversa, 0,2 μ l de cada iniciador a 10 μ M (Tabela 2); 5,0 μ l do Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems) e 2,1 μ l de água livre de RNase (Ultra Pure Distilled Water – Invitrogen), obtendo-se o volume final de 10,0 μ l. As reações foram realizadas em uma placa de 384 poços contendo marcador SYBR Green I, AmpliTaq Gold DNA Polimerase, dNTP, tampão e corante de referência passiva ROX, utilizando-se o equipamento Applied Biosystems ViiA™ 7. As condições de amplificação utilizadas foram de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 min., precedidos por 95°C por 3 min. Após a reação, a especificidade dos amplificados foi observada, conferindo-se a temperatura de

dissociação (T_m) dada pela curva de dissociação, específica para o transcrito-alvo.

A quantificação do RNA de DENV-3 nos cérebros dos camundongos foi realizada utilizando-se os iniciadores da tabela 4.

Para a análise dos dados foi utilizado o método da curva padrão relativa. A expressão do gene alvo foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase). Os resultados foram plotados como unidade relativa. Todas as reações foram feitas em duplicata para as amostras e em triplicata para a curva padrão. Para a análise da curva padrão foram utilizados seis pontos da curva, a fim de permitir a quantificação de todas as amostras selecionadas.

Tabela 4: Lista de iniciadores utilizados na qPCR.

GENE	Oligonucleotídeos	Amplicon	Referência
HPRT Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase	F 5' – GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G - 3'	163 pb	(DE SOUZA et al., 2013; ZOLINI et al., 2014)
	R 5' - GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG - 3'		
Nos2 Óxido nítrico sintase	F 5' – CAG CTG GGCTGT ACA AAC CTT - 3'	95 pb	(DE SOUZA et al., 2013; ZOLINI et al., 2014)
	R 5' - CAT TGG AAG TGA AGC GTT TOG - 3'		
IFN γ	F 5' - TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA - 3'	92 pb	(DE SOUZA et al., 2013)
	R 5' - TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG - 3'		
DENV - 5' URT DENV Região terminal não codificadora 5' do DENV	F 5' - TOG GAA GCT TGC TTA ACG TAG - 3'	71 pb	(DE SOUZA et al., 2013)
	R 5' - TOC GTT GGT TGT TCA TCA GA - 3'		

4.16. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por reação de Griess

A avaliação da produção de NO baseou-se no protocolo para Reação de Griess (DRAPIER; WIETZERBIN; HIBBS, 1988;), adaptado por (ZOLINI et al.,

2014), para verificar produção de NO em camundongos intraperitoneais de C57BL/6.

4.16.1. Obtenção de macrófagos intraperitoneais de camundongos

Os animais infectados com DENV ou do grupo controle foram inoculados pela via intraperitoneal com 2,0 mL de tioglicolato a 3% (v/v). Quatro dias após a inoculação, os camundongos foram eutanasiados e foi feita a lavagem peritoneal para coleta das células, utilizando-se 5 mL de DMEM gelado acrescido de ciprofloxacino ($10 \mu\text{g/ml}$). Após este procedimento, foram recuperados pelo menos 3 ml de lavado peritoneal de cada animal, onde foram feitos "pools" das células por grupo de animais, as quais foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415R à temperatura de 4°C. O sobrenadante de cada amostra foi descartado e as amostras foram ressuspensas em 5,0 mL (1,0 mL por animal) de DMEM suplementado de 5% SFB e acrescido de ciprofloxacino ($10 \mu\text{g/ml}$).

A contagem do número de células viáveis foi realizada com auxílio do azul de tripan em câmara de Neubauer. O volume das amostras foi ajustado para 2×10^5 células por $100 \mu\text{L}$. Os macrófagos foram distribuídos em uma placa de 96 poços (Nunc Thermo Scientific), colocando-se $100 \mu\text{L}$ de suspensão de macrófagos em cada poço, seguido da incubação por 3h em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . O sobrenadante foi em seguida descartado e os poços foram lavados com $100 \mu\text{L}$ de DMEM sem SFB e sem antibiótico. Posteriormente, foram acrescentados $150 \mu\text{L}$ de DMEM 5% SFB em cada poço e a placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Como estímulo (vírus aos quais os macrófagos foram expostos) foi utilizado o vírus DENV 3 genótipo I (MOI = 1) no volume de $100 \mu\text{L}$ por poço (cinco poços por grupo), e incubado por 24 h em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Os poços utilizados como controle (4 poços por grupo) receberam somente meio de cultura, enquanto os poços correspondentes ao controle positivo foram estimulados com *S. aureus* ($3,0 \times 10^8$) por poço na concentração de 6×10^2 bactérias/poço; amostras em duplicata), diluído em meio DMEM 5% SFB. Depois do período de incubação em estufa a 37°C com 5% de CO_2 , o sobrenadante foi coletado e utilizado para a reação de Griess.

4.16.2. Quantificação da produção de óxido nítrico pela Reação de Griess

A avaliação da produção de óxido nítrico (NO) baseou-se no protocolo para Reação de Griess descrito por Zolini e colaboradores (ZOLINI et al., 2014), adaptado para verificar produção de NO em macrófagos intraperitoneais de camundongos.

Para a dosagem de NO, foram utilizados 50 μ L dos sobrenadantes coletados na placa de cultivo dos macrófagos peritoneais (item 5.9.1) e pipetados em placa de 96 poços juntamente com 50 μ L da solução C (solução A + solução B). Nesta placa também foi montada a curva padrão de referência para a leitura. A solução C foi aplicada tanto nas amostras controle e infectadas como na curva padrão. A curva padrão foi elaborada com o primeiro poço contendo 500 μ M e diluindo 1:2 seriadamente: (500 μ M – 250 μ M – 125 μ M – 62,5 μ M – 31,25 μ M – 15 μ M – 7 μ M), utilizando o nitrito de sódio (NaNO_2) diluído seriadamente em meio DMEM 5% SFB (soro fetal bovino), como referência para avaliar a concentração de NO nas amostras.

A solução C consiste na junção da solução A (Sulfenilamida 1% em 2.5% de ácido fosfórico H_3PO_4) com a solução B (N-(1 naftil) etil edediamina 0.1% em 2.5% de ácido fosfórico H_3PO_4).

A leitura foi feita em espectrofotômetro (Molecular Devices, VersaMax™ Tunable Microplate Reader) a 490nm, e valores expressos em mili molar (mM).

4.17. Teste de Soroneutralização (PRNT50) para DENV-3

Para o teste de soroneutralização, utilizou-se o protocolo adaptado de Russel e colaboradores (RUSSELL et al., 1967). Para a adesão da monocamada celular, foram implantadas 5×10^4 células BHK-21 em placas de 24 poços (1 mL / poço) em meio de cultura DMEM suplementado com 5% de SFB e antibióticos. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C em uma incubadora de células com 5% de CO_2 . Os vírus (DENV 3 genótipo I) foram diluídos (em meio de cultura DMEN suplementado com 5% de SFB) 1:10 e foram adicionados 100 μ L desta solução a 10 mL de DMEM a 5%. Em

microtubos separados, o complemento do soro foi inativado a 56°C por 30 minutos. O soro foi diluído novamente (1:20, 1:40, 1:80) para ser acrescido da solução contendo o vírus (170 µL de soro + 170 µL de vírus) e incubada no agitador à temperatura ambiente durante 30 minutos. Foi utilizado 50 p.f.u de vírus por poço. O meio de cultura das células foi descartado e foram adicionados 150 µL da mistura de vírus + soro, sendo a adsorção realizada durante 45 minutos em estufa com 5% de CO₂. Ao poço correspondente ao controle de células, foi adicionado somente meio de cultura. O poço do controle de vírus recebeu somente a suspensão viral e ao poço de controle de soro foi adicionado soro oriundo de animais não infectados por DENV. Após o período de incubação, a suspensão viral foi descartada e adicionou-se 1 mL/poço de meio DMEM contendo 1% de CMC (Sigma, Alemanha) e 2% de soro fetal bovino inativado por calor (Gibco, EUA). As placas foram incubadas a 37°C durante 7 dias em uma incubadora de células com 5% de CO₂. Após 7 dias de incubação, as placas foram fixadas durante 1 hora com 3,7% de formaldeído diluído em PBS, seguido da coloração com solução de cristal violeta a 1% durante 20 minutos. Foi realizada a contagem do número de placas de lise tanto nos poços contendo soros dos animais infectados como nos poços contendo soro dos animais do grupo controle. O índice PRNT50 foi calculado pela maior diluição do soro capaz de neutralizar 50% do vírus.

4.18. Cytometry Beads Array - (CBA)

Os tecidos foram coletados, macerados e armazenados em uma solução inibidora de protease (Complete, Mini, sem EDTA). Utilizou-se 25 µL/poço do macerado do órgão em placa de 96 poços de fundo em V. Em seguida, foram adicionados a cada poço 18 µL do mix de reação de CBA (mouse inflammation kit BD Cytometric Bead Array - CBA (BD-BECTON, 2008). A preparação da curva padrão, as lavagens e a incubação com o anticorpo secundário foram realizados segundo preconizado no protocolo do kit. As amostras foram lidas no aparelho FACSCan (BD Biosciences) e a análise dos resultados foi feita no software CellQuest (BD Biosciences), sendo os resultados representados em pg/mL.

4.19. Contagem de células sanguíneas

O sangue dos animais infectados com DENV ou do grupo controle foi coletado após os animais serem anestesiados conforme previamente descrito neste documento. As amostras de sangue foram coletadas pelo plexo braquial e foram adicionadas a tubos contendo EDTA (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, EUA). A contagem dos glóbulos vermelhos (diluídos em PBS 1: 200), plaquetas (diluídas em oxalato de amônio 1: 100) e leucócitos (diluídos na solução azul de turks 1:20) foram realizadas manualmente em uma câmara de Neubauer. Os monócitos, os neutrófilos e os linfócitos foram contados manualmente em uma lâmina de esfregaço de sangue previamente fixada e corada. A coloração foi feita utilizando o kit de coloração panótico, onde cada lâmina foi mergulhada 5 vezes no fixador (solução de triarilmetano 500 ml), 5 vezes no corante ácido (solução de xantenos 500 ml) e sete vezes no corante básico (solução de tiazinas 500 ml).

4.20. Atividade das transaminases aspartato aminotransferase e alanino aminotransferase

A atividade das transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foi quantificada em amostras de soro individuais e foram utilizados marcadores associados ao dano hepático, como controle positivo. Para isso foi utilizado um kit colorimétrico comercial (Bioclin, Brasil). Para leitura dos resultados, foi preparada uma curva de calibração e posteriormente foi realizado teste de dosagem da atividade das transaminases. Para a dosagem de AST alíquotou-se 125 μ l do reagente 1 e incubou-se por 3 minutos a 37°C. Foram adicionados 50 μ l do soro, seguido da incubação por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 125 μ l do reagente 2, permanecendo a reação em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 1250 μ l de NaOH, permanecendo a reação em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em 505nm, sendo a cor estável por 30 minutos. Para a dosagem de ALT alíquotou-se 125 μ l do reagente 1 e incubou-se por 3 minutos a 37°C.

Foram adicionados 25 μ l do soro e incubou-se por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 125 μ l do reagente 2, permanecendo a reação em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, foram adicionados 1250 μ l de NaOH, permanecendo a reação em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em 505nm, sendo a cor estável por 30 minutos. Os resultados foram expressos em U/ml de soro.

4.21. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas usando o programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Os grupos amostrais foram avaliados e considerados não paramétricos ou paramétricos, de acordo com teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Foram utilizados os testes estatísticos Mann-Whitney (para grupos amostrais não paramétricos) ou teste t (para grupos amostrais paramétricos). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Modelo de infecção por via intracraniana de camundongos imunocompetentes

5.1.1. Variação percentual de peso e curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 infectados com DENV por via intracraniana

A infecção intracraniana realizada neste nosso trabalho atual (Figura 12 e 13) foi para comparar a perda de peso ocorrida com esse tipo de infecção descrita anteriormente (DE SOUZA et al., 2013; FERREIRA et al., 2010) com a perda de peso obtida após a infecção subcutânea, utilizando a mesma amostra de camundongos e o mesmo vírus altamente virulento. O objetivo destes experimentos foi repetir os experimentos já publicados (DE SOUZA et al., 2013; FERREIRA et al., 2010), demonstrando que este modelo (camundongos e vírus) está funcionando em nossas mãos, para em seguida introduzir outro modelo de infecção por via subcutânea, utilizando os mesmos camundongos e o mesmo vírus DENV 3 genótipo I. Além disso, o objetivo foi também realizar alguns experimentos que ainda não tinham sido realizados neste modelo de via intracraniana. O DENV Mochizuki foi utilizado por ser referência em vírus neurovirulento mortal.

Após a infecção, os animais foram observados diariamente durante 20 dias para acompanhamento do peso e o surgimento dos sinais clássicos de encefalite. Conforme mostrado na figura 12, a inoculação com os isolados de DENV altamente virulentos resultou em significativa perda de peso (Figura 12A e 12B) e na morte dos animais C57BL/6 (Figura 12A e 12B), enquanto os animais dos grupos controle (C57BL/6) não apresentaram perda de peso (Figura 12A e 12B) nem mortalidade (Figura 13A e 13B).

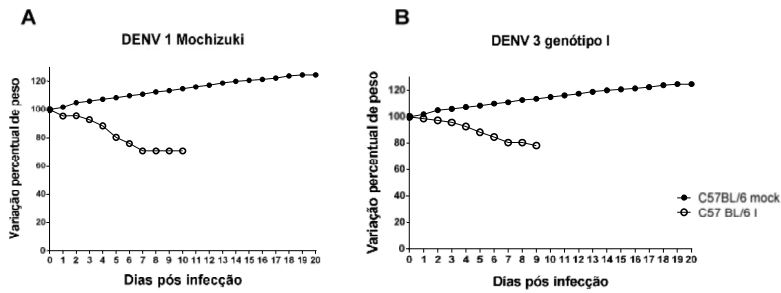


Figura 12: Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 infectados com DENV neurotrópicos. Os camundongos receberam inoculo de 400 u.f.p. de vírus por via IC (10 ul) e a variação de peso foi avaliada durante 20 dias. d.p.i. = dias após a infecção. mock (receberam inoculo de 10 ul de sobrenadante de células C6/36 por via IC). Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. A) DENV1 Mochizuki; B) DENV3 genótipo I. n= 6 animais por grupo.

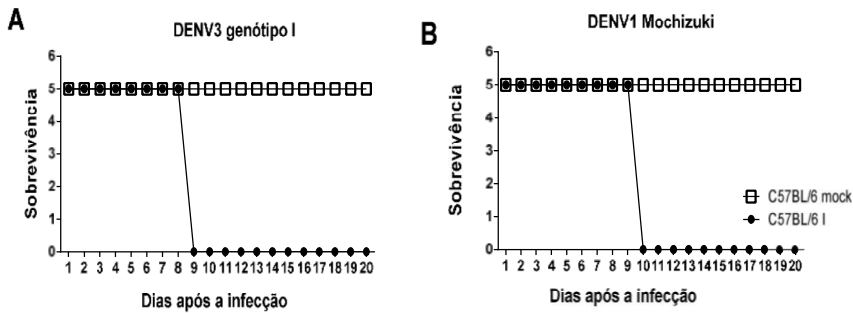


Figura 13: Curva de sobrevivência em camundongos C57BL/6 infectados com DENV neurotrópicos. Os camundongos receberam inoculo de 400 u.f.p. de vírus por via IC e a mortalidade foi avaliada durante 20 dias. mock (receberam inoculo de 10 ul de sobrenadante de células C6/36 por via IC). d.p.i. = dias após a infecção. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. A) DENV1 Mochizuki; B) DENV3 genótipo I. n= 6 animais por grupo.

Como observado nas figuras 12 e 13, os animais vieram a óbito entre o nono e o décimo dia após a infecção, tanto com a amostra de DENV3 genótipo I, como com a amostra de DENV1 Mochizuki. Estes animais foram avaliados diariamente e além da significativa perda de peso, todos os animais infectados apresentaram os sinais clássicos de encefalite (ericação de pelo, encurvamento de dorso e hemiparesia) visíveis a olho nu. Os animais do grupo controle (mock), que receberam apenas sobrenadante de células C6/36, permaneceram saudáveis e ganhando peso, ao longo de todo experimento. Cada grupo de animais possuía entre 5 e 6 animais por gaiola.

5.1.2. Sinais clínicos de encefalite em camundongos C57BL/6 infectados por via intracraniana com DENV 3 genótipo I

É importante salientar o fato de que os camundongos infectados com ambas amostras altamente virulentas de DENV, apresentaram os sinais clássicos de encefalite causada por DENV (Figura 14). Os principais sinais clínicos foram o ericação dos pelos, a hemiparesia de membros inferiores e o encurvamento do dorso.

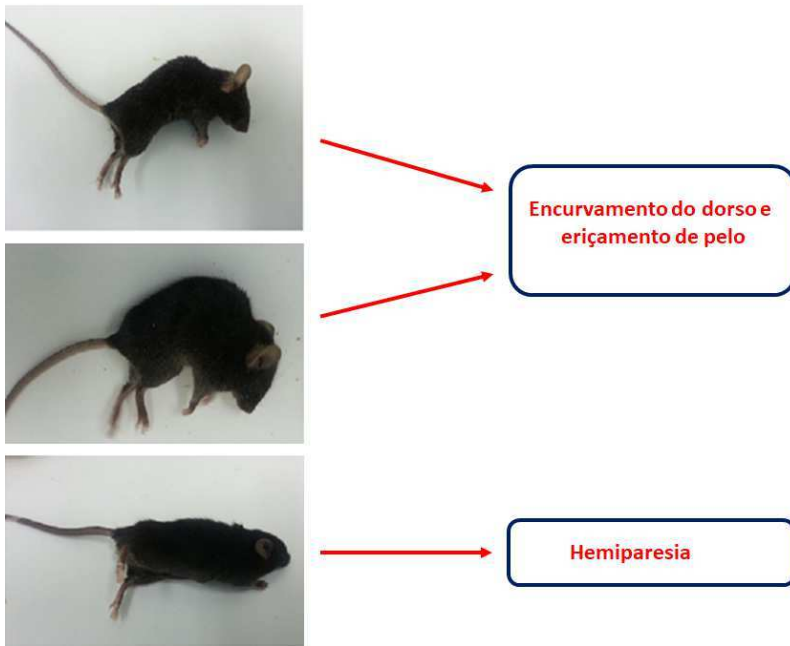


Figura 14: Camundongos C57BL/6 com sinais clássicos de encefalite causada por DENV. Camundongos apresentam encurvamento de dorso, eriçamento de pelo e hemiparesia dos membros traseiros, após infecção com DENV.

Como pode ser visto na figura 14, os animais infectados com as amostras de DENV altamente virulentas, apresentaram além da significativa perda de peso, os sinais clássicos de encefalite causada por DENV. Estes animais (infectados), apresentaram inicialmente o eriçamento do pelo, seguido da hemiparesia e encurvamento do dorso, e por fim, vinham a óbito. Os animais do grupo controle (mock), não apresentaram nenhum destes sinais e mantiveram-se estáveis durante todo o experimento.

5.2. Infecção subcutânea em camundongos C57BL/6 infectados com DENV 3 genótipo I

5.2.1. Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea com DENV 3 genótipo I

Após inóculo subcutâneo, foi realizada uma nova curva com a variação percentual de peso, onde os animais foram acompanhados durante 60 dias para avaliar a susceptibilidade à infecção por DENV altamente virulento (Figura 15).

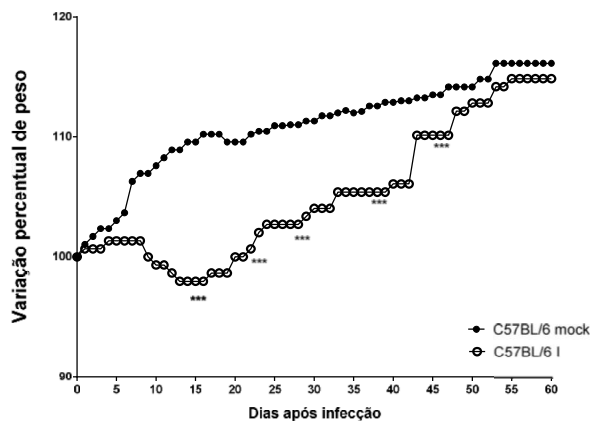


Figura 15: Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 infectados com DENV3 genótipo I por via subcutânea (SC). Os camundongos receberam inóculo subcutâneo de 50.000 p.f.u. e foram monitorados quanto à variação de peso por 60 dias. mock (receberam inóculo de 10 ul de sobrenadante de células C6/36 por via IC). d.p.i. = dias após a infecção. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. *** $p < 0.0001$ quando comparados não infectados (NI) com infectados (I), nos dias 15, 23, 3, 39, 47, 55, 57 após a infecção, usando o teste t. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. n= 6 animais por grupo.

Foi possível perceber durante a infecção subcutânea, que os animais infectados com DENV3 genótipo I, apresentaram uma perda significativa de peso entre os dias 8 a 16 após a infecção, mas não apresentaram mais nenhum sintoma aparente de dengue ou de encefalite causada por dengue, apesar do vírus inoculado ser altamente virulento. Foi possível perceber também, que estes animais infectados, apesar de apresentarem uma

significativa perda de peso inicialmente, eles conseguiram manter-se estáveis e foram recuperando gradativamente o peso ao longo dos dias observados, voltando a estarem próximos do peso dos animais do grupo controle (mock) que receberam apenas sobrenadante de células C6/36 e mantiveram o ganho natural de peso.

5.2.2. Alterações hematológicas em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea com DENV 3 genótipo I

Camundongos C57BL/6 foram inoculados por via subcutânea com 50.000 u.f.p. de DENV3 genótipo I para que se pudesse avaliar a evolução da infecção em diferentes tempos baseados nos tempos de resposta imune inata (6 horas após infecção) e adquirida (8 dias após infecção). As contagens hematológicas foram realizadas antes e após a infecção subcutânea (Figura 16). Como referência de valores hematológicos para camundongos utilizamos a dissertação de mestrado de Fernanda Trindade Lima Araújo (ARAÚJO, 2012) e CONNELL et al. (2015).

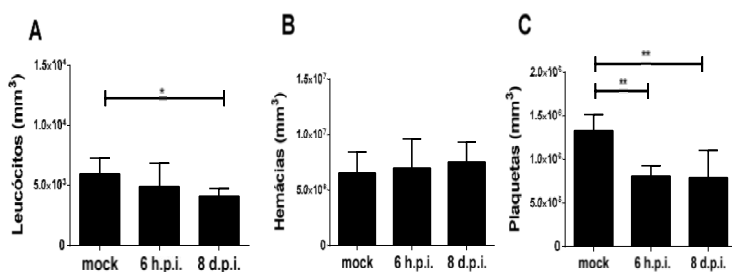


Figura 16: Contagem de leucócitos, glóbulos vermelhos e plaquetas após inoculação subcutânea de DENV. Os camundongos C57BL/6 receberam inóculo subcutâneo de 5×10^4 u.f.p. de DENV 3 genótipo I e foram eutanasiados 6 horas ou 8 d.p.i. e o sangue foi coletado em tubos contendo EDTA para subsequentes contagem de leucócitos, hemácias e de plaquetas. h.p.i. = horas após a infecção; d.p.i. = dias após a infecção. mock (inóculo sobrenadante de células C6/36). As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. A) leucócitos de camundongos C57BL/6; B) Hemácias de camundongos C57BL/6, C) Plaquetas de camundongos C57BL/6. $n = 6$ animais por grupo.

Observou-se uma diminuição na contagem de leucócitos nos animais C57BL/6 infectados por via subcutânea no oitavo dia após a infecção, quando comparado aos animais não infectados (Figura 16 A); por outro lado, não houve diferença significativa na contagem de eritrócitos nos camundongos C57BL/6 (Figura 16 B) em qualquer um dos tempos estudados quando comparados aos animais não infectados. Houve significativa diminuição do número de plaquetas nos camundongos C57BL/6 infectados em ambos os tempos avaliados após a infecção (Figura 16 C).

Também foram avaliadas possíveis alterações na contagem dos linfócitos, monócitos e neutrófilos após a infecção subcutânea com DENV3 genótipo I. O sangue foi coletado 6 horas e 8 dias após a infecção (figura 17). Não houve diferença significativa na contagem de linfócitos nos animais C57BL/6 quando comparados aos animais não infectados (Figura 17 A). Tampouco houve diferença significativa na contagem de neutrófilos nos animais C57BL/6 infectados em comparação com aquela mensurada nos animais não infectados (Figura 17 B). Por outro lado, foi detectada uma diminuição na contagem de monócitos observada 6 horas após a infecção nos animais C57BL/6, sendo que este valor voltou a ficar próximo ao dos camundongos não infectados, 8 dias após a infecção (Figura 17 C). Esta diminuição na contagem de monócitos pode se dar ao fato dos monócitos migrarem para os tecidos logo após a infecção para auxiliar no combate a infecção, voltando a contagem normal no oitavo dia após a infecção (YONG et al., 2017).

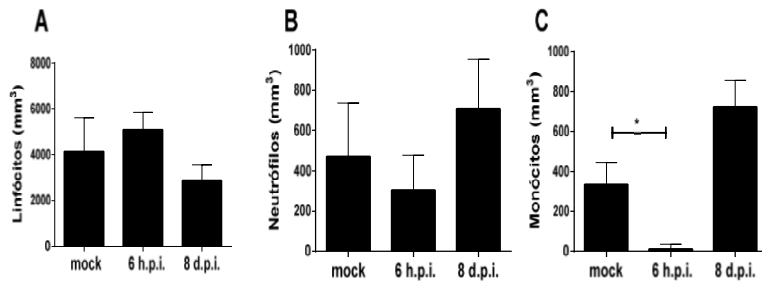


Figura 17: Contagem de linfócitos, monócitos e neutrófilos após inoculação subcutânea de DENV. Os camundongos C57BL/6 receberam inóculo subcutâneo de 5×10^4 u.f.p. de DENV 3 genótipo I e foram eutanasiadas 6 horas ou 8 dias após a infecção e o sangue foi coletado em tubos de EDTA para subsequentes contagem de linfócitos, monócitos e neutrófilos. h.p.i. = horas após a infecção; d.p.i. = dias após a infecção. mock (inóculo sobrenadante de células C6/36). As análises estatísticas foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. A) linfócitos C57BL/6; B) neutrófilos C57BL/6. C) monócitos C57BL/6. n= 6 animais por grupo.

5.2.3. Produção de citocinas em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea com DENV 3 genótipo I

A produção de citocinas no baço e no fígado de animais C57BL/6 foi avaliada por citometria de fluxo 6, 12 horas ou 8 dias após a infecção (Figura 18).

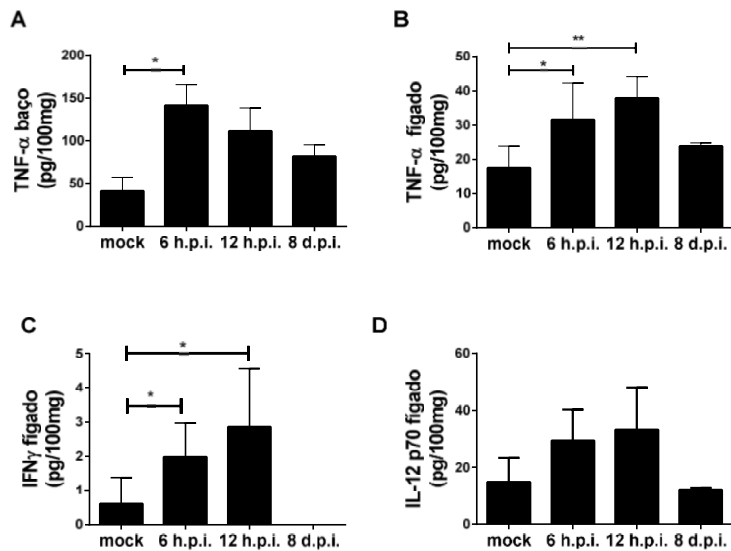


Figura 18: Citocinas são produzidas no baço e no fígado de camundongos, após o inóculo de DENV via SC. Os camundongos C57BL/6 foram inoculados por via subcutânea, com 5×10^4 u.f.p. de DENV 3 genótipo I e foram eutanasiados com 6 ou 12 horas ou 8 dias após a infecção e baço e fígado foram coletados e armazenados em uma solução de inibidor de protease. A) níveis de TNF- α no baço dos animais C57BL/6; B) níveis de TNF- α no fígado dos animais C57BL/6; C) níveis de IFN γ no fígado de animais C57BL/6; D) Níveis de IL-12p70 no fígado dos animais C57BL/6. Foi utilizado o mouse inflammation KIT, que detecta IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF, IL-12p70. As citocinas que não apresentaram valores superiores ao limite de detecção não foram apresentadas na figura. mock (os camundongos receberam o inóculo de sobrenadante celular C6 / 36); h.p.i: horas após infecção; d.p.i: dias após a infecção. As análises estatísticas foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. * p <0,05; ** p <0,01. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. n= 6 animais por grupo.

Nos animais C57BL/6 infectados, foi observado o aumento da produção de TNF- α no baço 6 horas após a inoculação subcutânea de DENV (Figura 18 A). Além disso, houve aumento da produção de TNF- α no fígado dos camundongos C57BL/6, 6 e 12 horas após a infecção (Figura 18 B). Houve significativo aumento dos níveis de IFN γ no fígado dos animais C57BL/6, 6 e 12 horas após a infecção com DENV (Figura 18 C). Por outro lado, não houve aumento da produção de IL12-p70 e IFN γ nos baços dos camundongos

C57BL/6 infectados (dados não mostrados). Não houve qualquer alteração da produção da citocina IL-12p70 no fígado dos camundongos C57BL/6 infectados em todos os tempos avaliados após a infecção (Figura 18 D).

5.2.4. Alterações hepáticas em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea com DENV 3 genótipo I

Dosagens de enzimas hepáticas foram realizadas após infecção com 5X10⁴ u.f.p. de DENV3 genótipo I pela via subcutânea, em camundongos C57BL/6. Os soros dos animais foram coletados em diferentes tempos após a infecção (3, 6 e 12 h.p.i. e 8 e 15 d.p.i.) e utilizados para a dosagem dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (Figura 19).

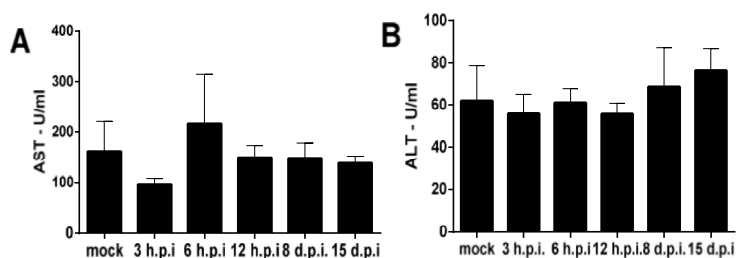


Figura 19: Dosagem de transaminases no soro de camundongos C57BL/6 após infecção subcutânea. Os animais foram infectados com 50.000 u.f.p. de DENV3 genótipo I por via subcutânea e o soro foi coletado nos tempos indicados. A) AST em camundongos C57BL/6; B) ALT em camundongos C57BL/6. As análises estatísticas foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. h.p.i. = horas após a infecção; d.p.i. = dias após a infecção. mock (inoculo com sobrenadante de células C6/36). n= 6 animais por grupo.

Não foi encontrada diferença na dosagem das transaminases AST e ALT nos animais C57BL/6 infectados quando comparados aos não infectados, em nenhum dos tempos estudados (3, 6 e 12 h.p.i. e 8 e 15 d.p.i.), conforme mostra a Figura 19. Estes resultados já eram esperados uma vez que alterações na dosagem das transaminases em casos de dengue, está relacionada a dengue grave (JOHN; LIN; PERNG, 2015), o que não aconteceu

no nosso caso, uma vez que os animais infectados não evoluíram para dengue grave.

5.3. Infecção subcutânea experimental de camundongos com mosquitos *Aedes aegypti* infectados com DENV 3 genótipo I

Sabendo que o DENV é transmitido pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, decidimos avaliar o modelo de infecção de camundongos utilizando picadas de fêmeas de mosquitos infectadas por DENV.

Para esse fim, fêmeas de mosquitos *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) foram infectadas através de nanoinjeção com 400 u.f.p. do vírus DENV3 genótipo I. Sete dias após a infecção, os insetos foram colocados na presença de camundongos C57BL/6 anestesiados para realizarem o repasto sanguíneo nesses animais (Figura 20). Os camundongos foram eutanasiados 90 horas após a infecção e o cérebro foi coletado para realização de qPCR, a fim de avaliarmos a expressão de mRNA viral e da enzima *nos2*, importante na defesa contra DENV.

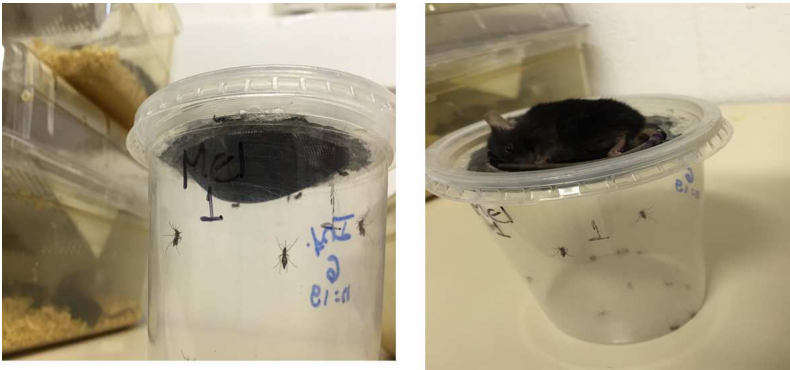


Figura 20: Infecção de camundongos com *Aedes aegypti*. Fêmeas de *Aedes* infectadas já alimentadas e ainda se alimentando no camundongo dentro dos potes.

5.3.1. Detecção do mRNA do vírus e de nos2, por qPCR, em camundongos C57BL/6 picados por *Aedes aegypti* fêmeas infectadas

Uma vez que a via de inoculação foi o mosquito infectado, sendo esta via subcutânea, foi dosada a presença do RNA genômico no baço, caracterizando assim, a eficácia da infecção. O RNA genômico de DENV foi detectado no baço de animais C57BL/6 infectados (Figura 20) após a picada do mosquito *A.aegypti*,

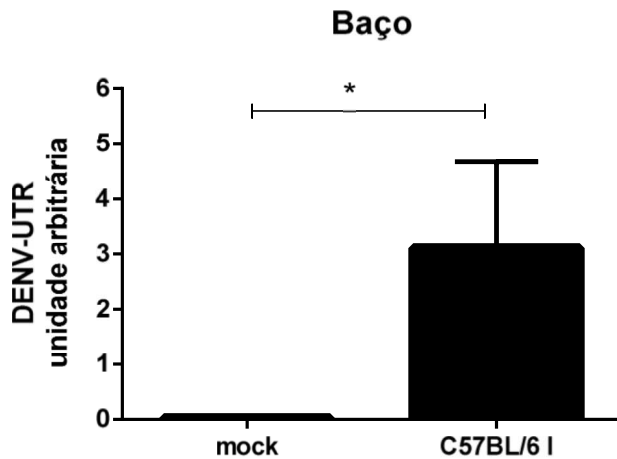


Figura 21: mRNA de DENV no baço de camundongos C57BL/6 infectados pela picada de *Aedes aegypti* previamente infectados com 400 u.f.p. de DENV3 genótipo I. Fêmeas de *Aedes* foram infectadas através de nanoinjeções e após 7 dias foram colocadas para se alimentar do sangue dos camundongos. Os camundongos foram eutanasiados após 90 horas. O RNA foi extraído do cérebro, foi feita a reação da transcriptase reversa e PCR quantitativa. A análise foi feita pelo método da curva padrão relativa. * = $p < 0,05$. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. mock (expostos a picadas de insetos que receberam sobrenadante de célula C6/36, sem vírus) e C57BL/6 I= animais infectados. n= 6 animais por grupo.

Uma vez que o DENV3 genótipo I se mostrou altamente virulento quando inoculado por via IC, e a presença ou ausência de nos2 no cérebro já foi comprovada como sendo um diferencial na sobrevivência ou não a este vírus, foi realizada a dosagem dos níveis de nos2 no cérebro dos animais infectados por este vírus, porém através da picada do mosquito infectado como

via de infecção. Conforme mostrado na figura 22, níveis significativamente aumentados do mRNA de *nos2* foram detectados no cérebro dos animais C57BL/6 infectados.

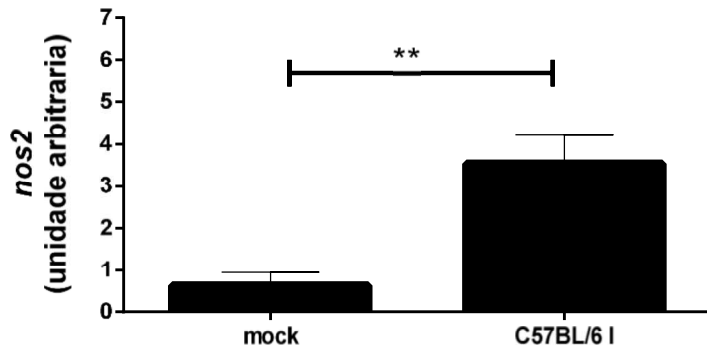


Figura 22: mRNA de *nos2* no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados pela picada de *Aedes aegypti* previamente infectados com 400 u.f.p. de DENV3 genótipo I. Fêmeas de *Aedes* foram infectadas através de nanoinjeções e após 7 dias foram colocadas para se alimentar do sangue dos camundongos. Os camundongos foram eutanasiados após 90 horas. O RNA foi extraído do cérebro, foi feita a reação da transcriptase reversa e PCR quantitativa. A análise foi feita pelo método da curva padrão relativa. ** = $p < 0,01$. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. mock (expostos a picadas de insetos que receberam sobrenadante de célula C6/36, sem vírus) e C57BL/6 I= animais infectados. n= 6 animais por grupo.

5.4. Produção de Óxido Nítrico em macrófagos intraperitoneais

Uma vez que publicações anteriores do nosso grupo (DE SOUZA et al., 2013) mostraram que os camundongos nocautes para *nos2* foram resistentes à infecção com ambas as amostras neurovirulentas de DENV3 genótipo I e DENV 1 Mochizuki, avaliamos a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais oriundos de camundongos C57BL/6, expostos a DENV3 genótipo I. A título de controle positivo, avaliamos a produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com *S. aureus* (Figura 23).

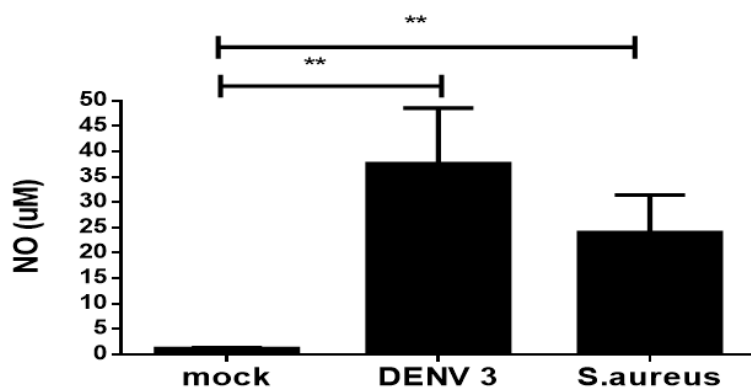


Figura 23: Produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos peritoneais ex vivo de camundongos selvagens C57BL/6. Os macrófagos peritoneais coletados foram expostos a DENV 3 genótipo I (MOI=1), *S. aureus* (6×10^2 bactérias/poço) ou meio DMEM 5% SFB+Ciprofloxacino10μg/ml (controle). A dosagem de óxido nítrico foi realizada empregando o método de Griess. Mock- não expostos ** $p < 0,01$. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. $n = 6$ animais por grupo.

Conforme mostrado na figura 23, nos macrófagos dos camundongos C57BL/6 expostos a DENV 3 genótipo I, foi possível observar um aumento significativo na produção de óxido nítrico em relação aos macrófagos de camundongos C57BL/6 não expostos a DENV3 genótipo I.

5.5. Infecção com DENV 3 genótipo I, via subcutânea seguida de via intracraniana em camundongos C57BL/6

5.5.1. Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 infectados por via SC-IC com DENV 3 genótipo I

Realizamos uma infecção inicial pela via subcutânea, com inóculo de 50.000 u.f.p. DENV3 genótipo I e após 14 dias foi realizada nova infecção por

via IC, com 400 u.f.p. de vírus (Figura 24). Os animais, embora tenham apresentado uma perda de peso significativa, recuperaram parte do peso e não apresentaram sinais de encefalite, sobrevivendo ao desafio. Isto mostra que a infecção por via subcutânea conferiu resistência do C57BL/6 ao vírus altamente virulento por via intracraniana.

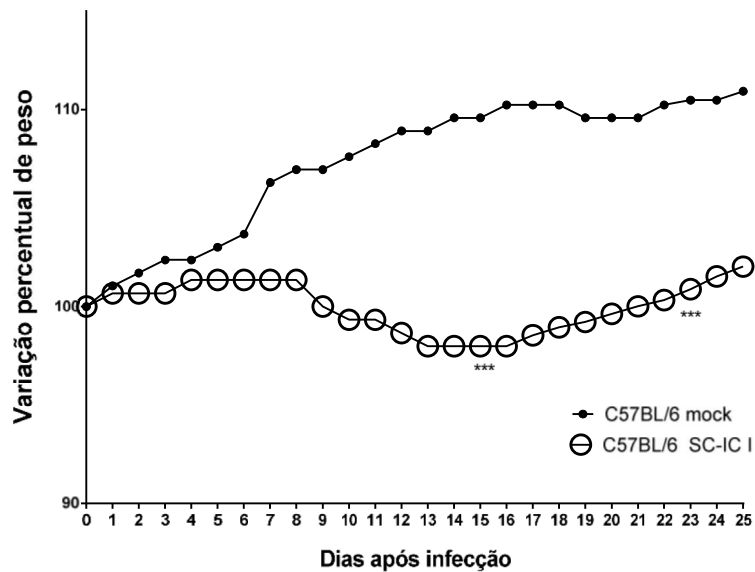


Figura 24: Variação percentual de peso em camundongos C57BL/6 infectados com DENV3 genótipo I via IC 14 dias após infecção subcutânea. Os camundongos receberam inoculo subcutâneo de 50.000 p.f.u. e foram monitorados quanto à variação de peso por 14 dias, quando foram inoculados com 400 u.f.p. de vírus por via IC. A variação de peso desses animais foi monitorada durante 25 dias. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. *** $p < 0.0001$ quando comparando camundongos não infectados (mock, receberam inoculo de sobrenadante de células C6/36 por via SC e 14 dias após inoculo intracraniano de sobrenadante de células C6/36) com infectados (I) nos dias 15 e 23 após a infecção usando o teste t. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. n= 6 animais por grupo.

5.5.2. Titulação viral e soro-neutralização em camundongos C57BL/6 infectados com DENV 3 genótipo I

A fim de avaliarmos se a infecção por DENV pelas vias intracraniana e subcutânea obtiveram sucesso e também para avaliarmos o impacto da inoculação prévia pela via subcutânea, mensuramos a carga viral no cérebro dos animais desafiados, por titulação em placa de lise, em células BHK-21 e avaliamos a presença de anticorpos séricos anti-DENV pela técnica de soro-neutralização nos animais infectados pela via subcutânea. Os resultados na tabela 5 mostraram que houve crescimento de vírus no cérebro (infecção IC) com 5 dias após a infecção e que no sétimo dia após a infecção a quantidade do vírus aumentou em relação ao quinto dia. Os títulos de anticorpos detectados nos soros dos animais infectados (infecção subcutânea) foram maiores do que o dos animais não infectados, mostrando que houve resposta imune dos animais ao vírus, após a infecção.

Tabela 5: Título viral e Soroneutralização

	Título viral p.f.u. x 10 ⁴ (cérebro, IC)	Título viral p.f.u. x 10 ⁴ (cérebro, SC-IC)	Título viral p.f.u. x 10 ⁴ (soro, SC)	Soro neutralização (SC)
0 dpi	-----	-----	-----	
3 dpi	-----	-----	-----	0 dpi <20
5 dpi	1.2 (± 0.19)	1.4 (± 0.19)	1.3 (± 0.19)	60 dpi ≥ 80
7 dpi	29 (± 1.7)	30 (± 1.7)	20 (± 2.5)	

Para a titulação do vírus no cérebro após inoculação IC com 400 p.f.u. de DENV ou com o sobrenadante de células C6/36 (controle), os camundongos C57BL/6 foram eutanizados para remoção do cérebro nos dias 3, 5 e 7 após a infecção. Para a titulação do vírus no cérebro após infecção por via SC-IC, os camundongos C57BL/6 foram inoculados via SC com 5x10⁴ p.f.u. de DENV ou com sobrenadante de células C6/36 (controle) e 14 dias após esta infecção, os camundongos foram novamente inoculados por via IC com 400 p.f.u. de DENV ou com sobrenadante de células C6/36 (controle) e foram eutanizados para remoção do cérebro nos dias 3, 5 e 7 após esta segunda inoculação. Para a titulação de vírus no soro, após inoculação via SC com 5x10⁴ p.f.u. de DENV ou com sobrenadante de células C6/36 (controle), o soro foi recolhido 3, 5 e 7 dias após a infecção. Para o teste de seroneutralização (PRNT50), camundongos C57BL/6 foram inoculados via SC com 5X10⁴ p.f.u. de vírus ou com sobrenadante de células C6/36 (controle) e amostras de soro foram recolhidas 60 dias após a infecção. d.p.i. = dias após a infecção.

5.5.3. Detecção do mRNA viral, $IFN\gamma$ e nos2, por qPCR, em camundongos C57BL/6 infectados por via SC-IC com DENV 3 genótipo I

Foi avaliado o nível de mRNA de DENV no cérebro (figura 25 A) dos animais infectados tanto por via intracraniana (IC) como por via subcutânea seguida de via intracraniana (SC-IC). Houve diferença significativa na expressão de mRNA do vírus nos animais infectados quando comparados aos não infectados, tanto nos animais inoculados apenas por via IC como nos animais inoculados por via SC e posteriormente por via IC (Figura 25 A). Foi avaliado o nível de mRNA de DENV no fígado dos animais infectados por via SC (Figura 25 B) onde também foi possível perceber uma diferença significativa na expressão de mRNA do vírus em todos os tempos estudados quando comparados aos animais não infectados.

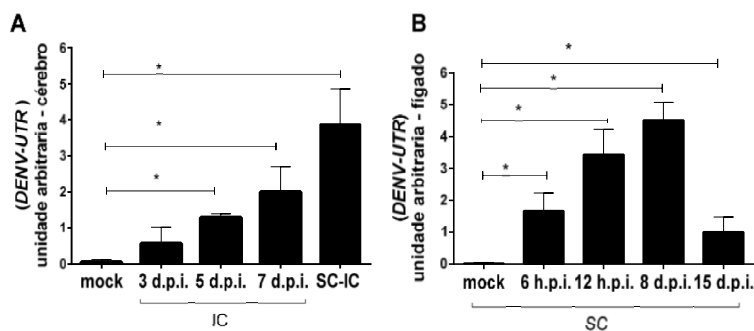


Figura 25: mRNA de DENV no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com DENV3 genótipo I por diferentes vias e no fígado por via SC. A) Os camundongos foram inoculados por via IC com DENV 3 genótipo I por via IC com 400 u.f.p.(IC). Outros camundongos receberam inoculo subcutâneo de 50.000 p.f.u. e foram monitorados quanto à variação de peso por 14 dias, quando foram inoculados com 400 u.f.p. de vírus por via IC (SC-IC), ou foram inoculados com sobrenadante de células C6/36 por via SC e 14 dias após inoculo intracraniano com sobrenadante de células C6/36 (mock = não infectados). Os camundongos foram eutanasiados 11 dias após a segunda infecção. B) Os camundongos infectados apenas por via SC, receberam inoculo subcutâneo de 50.000 p.f.u de DENV 3 genótipo I e foram eutanasiados nos tempos 6 e 12 h.p.i (horas após a infecção) e 8 e 15 d.p.i (dias após a infecção), ou foram inoculados com sobrenadante de células C6/36 por via SC (mock = não infectados). O RNA do cérebro e do fígado foi extraído e foi feita a reação da transcriptase reversa e qPCR. A análise foi feita pelo método da curva padrão relativa. * = $p < 0,05$. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Número de animais=5 por grupo. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. A) DENV cérebro via IC e via SC-IC; B) DENV fígado via SC. n= 6 animais por grupo.

Sendo o $\text{IFN}\gamma$ uma importante citocina na resposta imune, que possui, além de outras funções, a capacidade de inibir a replicação viral (SCHOENBORN; WILSON, 2007; VAZQUEZ; CATALAN-DIBENE; ZLOTNIK, 2015), obtivemos a expressão desta citocina no cérebro dos animais infectados por via SC-IC, sendo possível observar um aumento significativo na expressão de mRNA desta citocina nos animais infectados, quando comparados aos não infectados, diferentemente dos animais inoculados só por via IC, que não tiveram diferença dos animais não infectados (Figura 26).

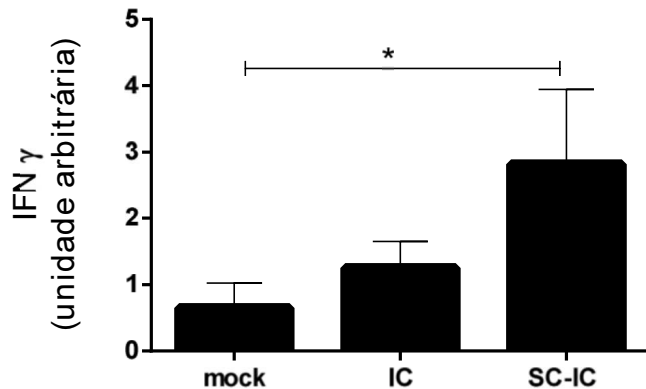


Figura 26: mRNA de IFN γ no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados. Os camundongos foram inoculados por via IC com DENV 3 genótipo I por via IC com 400 u.f.p. (IC). Na barra SC-IC, os camundongos receberam inóculo com 50.000 u.f.p. por via subcutânea e após 14 dias foram novamente infectados com 400 u.f.p. de DENV3 genótipo I por via IC. Os camundongos foram eutanasiados 26 dias após a infecção. mock = animais não infectados, foram inoculados com sobrenadante de células C6/36 por via SC e 14 dias após inóculo intracraniano com sobrenadante de células C6/36. O RNA foi extraído do cérebro, foi feita a reação da transcriptase reversa e PCR quantitativa. A análise foi feita pelo método da curva padrão relativa. * $p < 0,05$. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. $n = 6$ animais por grupo.

Conforme mostrado na figura 22, em infecção de camundongos por picada de mosquitos infectados por DENV e também agora na figura 27, com infecção subcutânea seguida de infecção intracraniana, níveis

significativamente aumentados do mRNA de nos2 foram detectados no cérebro dos animais C57BL/6 infectados.

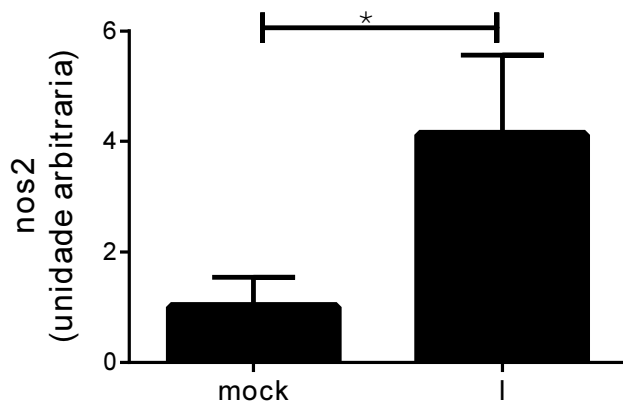


Figura 27: mRNA de nos2 no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados por via SC-IC. Os camundongos foram inoculados por via IC com 400 u.f.p. (IC) de DENV 3 genótipo I. Os camundongos infectados (I) receberam inóculo com 50.000 u.f.p. por via subcutânea e após 14 dias foram novamente infectados com 400 u.f.p. de DENV3 genótipo I por via IC. Mock = animais não infectados, foram inoculados com sobrenadante de células C6/36 por via SC e 14 dias após inóculo intracraniano com sobrenadante de células C6/36. Os camundongos foram eutanasiados 26 dias após a infecção. O RNA foi extraído do cérebro, foi feita a reação da transcriptase reversa e PCR quantitativa. A análise foi feita pelo método da curva padrão relativa. * $p < 0,05$. A análise estatística foi feita com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. $n = 6$ animais por grupo.

5.5.4. Produção de TNF- α em camundongos C57BL/6 infectados por via subcutânea e posteriormente por IC com DENV 3 genótipo I

A fim de avaliarmos a produção de TNF- α no baço dos animais infectados por via SC-IC, foi realizada citometria de fluxo (CBA) onde foi possível observar um aumento significativo na produção de TNF- α no baço dos animais infectados por via SC-IC conforme mostra a Figura 28.

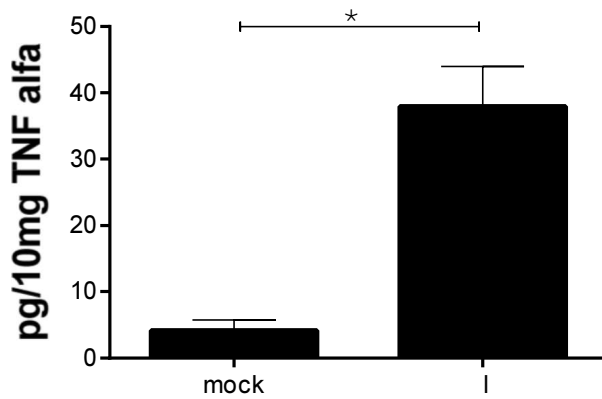


Figura 28: Produção de TNF- α no baço, após o inóculo de DENV via SC-IC. Primeiramente os camundongos receberam inóculo com 50.000 u.f.p. por via subcutânea e após 14 dias foram novamente infectados com 400 u.f.p. de DENV3 genótipo I por via IC. Os camundongos foram eutanasiados 26 dias após a infecção. Os níveis de TNF- α no baço foram avaliados por citometria de fluxo (CBA). Os baços foram coletados e armazenados em uma solução de inibidor de protease. Mock: não infectados (os camundongos receberam o inóculo de sobrenadante de células C6/36); I= infectado; d.p.i: dias após a infecção. As análises estatísticas foram feitas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. * $p < 0,05$. Foi utilizado o mouse inflammation KIT (CBA), que detecta IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF, IL-12p70. As citocinas que não apresentaram valores superiores ao limite detecção não foram apresentadas nesta figura. Este experimento foi realizado três vezes com resultados semelhantes. Foi utilizado o mouse inflammation KIT, que detecta IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF, IL-12p70. As citocinas que não apresentaram valores superiores ao limite detecção não foram apresentadas na figura. n= 6 animais por grupo.

6. DISCUSSÃO

Não há um bom modelo animal para estudar Dengue. Assim, existem vários modelos murinos (AKKINA, 2014; PLUMMER; SHRESTA, 2014; SHRESTA et al., 2006; WATANABE; CHAN; VASUDEVAN, 2016; ZOMPI; HARRIS, 2012), os quais se prestam para um determinado aspecto da doença, não existindo um modelo animal que mimetize o que ocorre no ser humano. Assim, devemos utilizar vários modelos para estudar diferentes aspectos da doença. No caso da resposta imune do hospedeiro é importante ter um modelo em que o vírus não seja modificado em laboratório e que os animais também não sejam modificados e sejam imunocompetentes, para que possamos conseguir dados consistentes de resposta imune contra a doença.

Recentemente, nosso grupo apresentou um modelo experimental de infecção intracraniano (IC) com um DENV altamente virulento (neurovirulento), para estudar a doença de dengue com complicações neurológicas (DE SOUZA et al., 2013; FERREIRA et al., 2010).

A infecção subcutânea é um modelo adicional que estamos apresentando neste trabalho, utilizando camundongos imunologicamente competentes infectados com vírus altamente virulento, para estudar a resposta imune contra a dengue, buscando um modelo menos agressivo quando comparado ao modelo de infecção intracraniano. A infecção subcutânea também é mais próxima de como as infecções ocorrem em seres humanos, que são infectados por picadas de mosquitos na pele. E uma vez que houve perda de peso dos animais neste tipo de infecção, embora não tenham ocorrido outros sinais clínicos clássicos, acreditamos que este modelo possa ser útil para o estudo da doença da dengue, para uma melhor compreensão da patogênese da doença.

Após a infecção subcutânea de camundongos com este DENV, foram observadas alterações hematológicas e imunológicas do hospedeiro, o que representa uma maneira de estudar dengue experimental no camundongo. Em nosso modelo de inóculo subcutâneo, não houve sinais clínicos de doença de dengue ou de encefalite, com exceção de que os camundongos C57BL/6

infectados apresentaram perda de peso do dia 10 ao 18º dia após a infecção, mantendo seu peso após este período (Figura 14). Na literatura há relatos da perda de peso em pacientes de dengue (HOTCHANDANI, 2014; VASSALLO, 2004).

Em nosso modelo de infecção subcutânea experimental em camundongos, os animais sofreram trombocitopenia (Figura 16 C) e monocitopenia (Figura 17 C) desde a sexta hora após a infecção, além de uma leucopenia (Figura 16 A) a partir do dia 8 após a infecção. Na literatura podem ser encontrados relatos de que a trombocitopenia ocorre em 80 a 100% de pacientes com dengue (LYE et al., 2017; SAHU et al., 2014; WHO, 2012; XAVIER et al., 2014). Vários autores relataram que a leucopenia é uma das características de dengue humana (KUTIYAL, 2017; SARATHY et al., 2015; WHO, 2012; XAVIER et al., 2014).

Mostramos em nosso modelo que o TNF alfa no baço e IFN gama no fígado de camundongos imunologicamente competentes aumentaram poucas horas após a infecção (Figura 18 A e C, respectivamente), mostrando a importância dessas citocinas disparadas pela imunidade inata para a defesa do hospedeiro contra um vírus de dengue altamente virulento, inoculado por via subcutânea. Foi relatado anteriormente que as citocinas IFN gama e TNF alfa são importantes na luta contra a dengue (NEELIKA et al., 2013; SOLOMON et al., 2000).

Uma maior produção de óxido nítrico (NO) foi observada em macrófagos peritoneais expostos a DENV, após infecção, quando comparados a macrófagos não expostos aos vírus (Figura 23). Como alternativa de inóculo subcutâneo, testamos também a infecção com DENV altamente virulento utilizando mosquitos *A. aegypti* infectados com este vírus para picar posteriormente os camundongos C57BL/6 (Figuras 20 a 22). Neste modelo foi possível observar um aumento significativo na detecção de mRNA de *nos2* (gene que codifica a enzima responsável pela posterior produção de óxido nítrico) no cérebro dos animais infectados quando comparados aos não infectados (Figura 22). Thein et al. (THEIN et al., 2017) relataram que existe uma associação entre o aumento da produção de óxido nítrico e o desenvolvimento da febre hemorrágica da dengue em adultos. Também foi relatado que a infecção por dengue causa aumento da enzima NOS2 e

aumento da produção de TNF alfa in vitro em células Raw (CHENG et al., 2015). Este aumento na detecção de mRNA de nos2 também foi observado na infecção subcutânea seguida de infecção intracraniana (Figura 27).

O $IFN\gamma$ desempenha um papel relevante na resposta imune a vírus tanto em humanos como em camundongos (VAZQUEZ; CATALAN-DIBENE; ZLOTNIK, 2015), sendo assim uma importante citocina a ser avaliada na resposta a infecções virais. Na infecção SC-IC foi possível observar um aumento significativo na detecção de mRNA de $IFN\gamma$ nos animais infectados (Figura 25) quando comparados aos não infectados.

Outra importante citocina pró-inflamatória, TNF- α , foi dosada no baço dos camundongos infectados por via SC-IC (Figura 28), onde foi observado um aumento significativo na produção desta citocina no baço dos animais infectados, quando comparados aos não infectados. Esta citocina pode estar relacionada com um possível aumento da permeabilidade endotelial em infecções por DENV conforme relatado na literatura (INYOO; SUTTITHEPTUMRONG; PATTANAKITSAKUL, 2017).

Surpreendentemente, a infecção prévia do camundongo por via subcutânea conferiu resistência a uma infecção intracraniana subsequente (Figura 24), diferentemente do que ocorreu com infecção só intracraniana (Figura 12 e 13), onde todos os animais infectados por via intracraniana morreram. A infecção subcutânea proporcionou uma resposta imunológica que impediu a nova infecção por via intracraniana de levar o animal à morte. Outra razão para a sobrevivência também poderia ser a produção de anticorpos neutralizantes após a infecção por via subcutânea, tal como apresentada na Tabela 5, que impediria a letalidade deste DENV na segunda infecção por via intracraniana.

O modelo apresentado neste trabalho tem suas limitações, como todos os outros modelos já mencionados na literatura, mas é um modelo adicional, que utiliza camundongos imunologicamente competentes, sendo infectado pela via subcutânea com um DENV altamente infeccioso. Este modelo é um modelo adicional interessante para o estudo da resposta imune ao vírus da dengue.

7. CONCLUSÃO

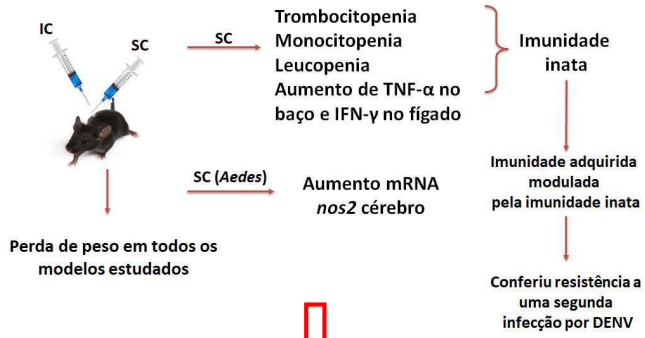
O presente estudo utilizou camundongos imunologicamente competentes infectados por via intracraniana, subcutânea e subcutânea-intracraniana com DENV altamente virulento, sendo que o modelo subcutâneo se mostrou um modelo adequado adicional para estudo da dengue, além dos que estão descritos na literatura. Foi mostrado também que uma infecção subcutânea pode proteger o animal de uma infecção intracraniana subsequente.

A infecção subcutânea é um modelo adicional, utilizando camundongos imunocompetentes infectados com vírus altamente virulentos para estudar a resposta imune contra a dengue, procurando um modelo menos agressivo, quando comparado ao modelo de inoculação intracraniana.

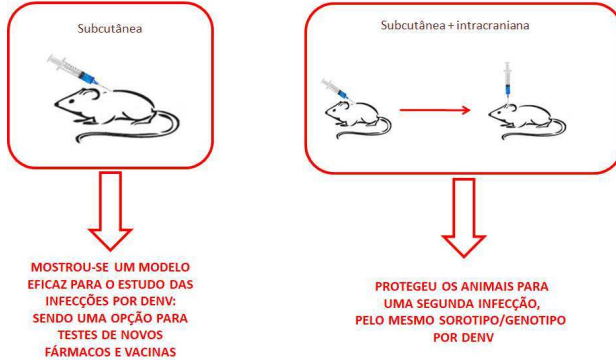
A infecção subcutânea também está mais próxima de como as infecções ocorrem em humanos, que são infectados por picadas de mosquitos na pele. Embora existam outros modelos murinos para o estudo da dengue, nenhum deles mostra todas as características da doença humana, portanto, são necessários mais de um modelo para cobrir vários aspectos da doença. Com isso, embora nosso modelo de infecção subcutânea não seja necessariamente melhor que o modelo de camundongos humanizados, é um modelo adicional, que é menos agressivo que o modelo de camundongos humanizados.

O modelo subcutâneo poderia ser usado para estudar a resposta imune dos vertebrados, drogas ou vacina contra o vírus da dengue, sendo um modelo menos invasivo e que reproduz alguns dos sintomas clínicos dos pacientes com dengue.

O esquema abaixo mostra, de forma resumida os nossos resultados e conclusões acerca do presente trabalho:



Modelos Utilizados



Vantagens

1. Modelo pouco invasivo;
2. Uso de animais imunocompetentes que possibilita um estudo mais próximo da resposta imune humana frente à infecção;
3. Uso de vírus não adaptado que permite uma resposta mais similar à dos seres humanos.

Contribuições

1. O modelo de infecção SC por DENV, menos invasivo, em camundongos imunocompetentes, para auxiliar nos estudos sobre a infecção causada por DENV e estudos futuros para testes de fármacos e/ou vacinas;
2. O modelo de duas infecções subsequentes, por vias distintas, que pode ser utilizado para compreender um pouco mais sobre dengue, usando camundongos imunocompetentes.

8. PERSPECTIVAS

Em virtude dos resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas futuras para a continuidade dos estudos sugerem que mais estudos devam ser realizados utilizando camundongos imunologicamente competentes com vírus não adaptado, para possibilitar um maior entendimento da evolução da doença e da atuação do sistema imune frente à infecção por DENV.

A possibilidade de ampliação de experimentos utilizando mosquitos do gênero *Aedes*, infectados com DENV altamente virulento, para a possível dosagem da produção de diferentes citocinas, também seria de grande relevância para a continuidade deste estudo.

Teste com fármacos e/ou vacinas também podem ser utilizados para a melhor compreensão dos mecanismos de resposta imune frente a infecção por DENV utilizando o modelo proposto neste trabalho.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S. Toll-like Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 40, p. 38105–38108, 2003.

AKKINA, R. Humanized Mice for Studying Human Immune Responses and Generating Human Monoclonal Antibodies. *Microbiology Spectrum*, n. May 2015, p. 1–12, 2014.

ALERTS, E. Innate and adaptive immunity. *Lupus*, v. 23, n. 5, p. 449–99, 2014.

AVIRUTNAN, P. et al. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 193, n. 8, p. 1078–1088, 2006.

BALSITIS, S. J. et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 2, 2010.

BD-BECTON, D. AND COMPANY. Mouse Inflammation Kit instruction manual. Europe, n. 552364, 2008.

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

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. *NIH-PA Author Manuscript Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2012.

BITENCOURT, G. A. et al. Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, v. 29, p. 22, 2011.

BRADY, O. J. et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical*

Diseases, v. 6, n. 8, 2012.

CAMPOS, M. A. et al. Neurotropic Dengue Virus Infections. In: Neurotropic Viral Infections. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 259–272.

CHAN, K. W. K. et al. Animal models for studying dengue pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, v. 123, p. 5–14, 2015.

CHEN, H.-C. et al. Both Virus and Tumor Necrosis Factor Alpha Are Critical for Endothelium Damage in a Mouse Model of Dengue Virus-Induced Hemorrhage. *Journal of Virology*, v. 81, n. 11, p. 5518–5526, 2007.


CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue-Quo tu et quo vadis? *Viruses*, v. 3, n. 9, p. 1562–1608, 2011.

CHENG, Y. et al. Dengue Virus Infection Causes the Activation of Distinct NF- κ B Pathways for Inducible Nitric Oxide Synthase and TNF α Expression in RAW264.7 Cells. 2015.

CLYDE, K.; HARRIS, E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication RNA secondary structure in the coding region of dengue virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selecti. *Journal of virology*, v. 80, n. 5, p. 2170–2182, 2006.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells *FEMS Microbiology Reviews*, 2015a.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 39, n. 2, p. 155–170, 2015b.

DALRYMPLE, N. A.; CIMICA, V.; MACKOW, E. R. Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I / MAVS Signaling by Blocking TBK1 / IRF3 Phosphorylation  [DOI](#)
Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence

Determinant. mBio, v. 6, n. 3, p. 1–12, 2015.

DE SOUZA, K. P. R. et al. Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement. Virology journal, v. 10, p. 267, 2013.

DICK, O. B. et al. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 87, n. 4, p. 584–593, 2012.

DIMMOCK, N. J.; EASTON, A. J.; LEPPARD, K. N. Introduction to Modern Virology. [s.l.: s.n.].

DRAPIER, J. C. C.; WIETZERBIN, J.; HIBBS, J. B. Interferon γ and tumor necrosis factor induce the L arginine dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. European Journal of Immunology, v. 18, n. 10, p. 1587–1592, 1988.

DULBECCO, R.; VOGT, M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, v. 18, p. 273–279, 1953.

ESTADO, M. D. E. et al. Ministério da Saúde. p. 1–7, 2013.

FARES, R. C. G. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. BioMed Research International, v. 2015, 2015.

FERREIRA, G. P. et al. Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. Microbes and Infection, v. 12, p. 546–554, 2010.

FIELDS, BERNARD N. & KNIPE, D. M. Fields Virology. 6th.ed. ed. Philadelphia: [s.n.].

FIGUEIREDO, L. B. et al. Dengue Virus 3 Genotype 1 Associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 2, p. 314–316, fev. 2008.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. *Microbes and Infection*, v. 2, n. 13, p. 1643–1649, 2000.

GLASNER, D. R. et al. Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. *PLOS Pathogens*, v. 13, n. 11, p. e1006673, 2017.

GONCALVEZ, A. P. et al. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 22, p. 9422–9427, 2007.

GREEN, A. M. et al. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses *Journal of Molecular Biology*, 2014.

GREEN, A. M. et al. *Antiviral Responses*. v. 426, n. 6, p. 1148–1160, 2015.

GUTIÉRREZ, G. et al. Evaluation of the Diagnostic Utility of the Traditional and Revised WHO Dengue Case Definitions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 8, p. 1–9, 2013.

GUZMAN, M. G. et al. Neutralizing antibodies after infection with dengue 1 virus. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n. 2, p. 282–286, 2007.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. *Nature Publishing Group*, v. 2, p. 1–26, 2016.

GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*, v. 2, n. 12, p. 2649–2662, 2010.

HALSTEAD, S. B. Dengue. *Lancet*, v. 370, n. 9599, p. 1644–1652, 2007.

HOTCHANDANI, A. Loss of appetite and strength in the geriatric population: Diagnostic symptoms for dengue. *Tropical Doctor*, v. 44, n. 3, p. 182–185, 2014.

INYOO, S.; SUTTITHEPTUMRONG, A.; PATTANAKITSAKUL, S. Synergistic Effect of TNF-alpha and Dengue Virus Infection on Adhesion Molecule Reorganization in Human Endothelial Cells. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 70, n. 2, p. 186–191, 2017.

JOHN, D. V.; LIN, Y.-S.; PERNG, G. C. Biomarkers of severe dengue disease – a review. *Journal of Biomedical Science*, v. 22, n. 1, p. 83, 2015.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, v. 11, n. 5, p. 373–84, 2010.

KUTIYAL, A. S. Dengue Haemorrhagic Encephalitis: Rare Case Report with Review of Literature. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 11, n. 7, p. 10–12, 2017.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. *Annual review of microbiology*, v. 62, p. 71–92, 2008.

LINDENBACH, B.D., C.L. MURRAY, H.-J. THIEL, C. M. R. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: D.M. KNIPE, ET AL (Ed.). *Fields Virology*. 6th Editio ed. New York, NY: [s.n.]. p. 747–794.

LYE, D. C. et al. Prophylactic platelet transfusion plus supportive care versus supportive care alone in adults with dengue and thrombocytopenia: a multicentre, open-label, randomised, superiority trial. *The Lancet*, v. 389, n. 10079, p. 1611–1618, 2017.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: An integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 4, p. 564–581, 2009.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history. *Trends in Microbiology*, v. 22, n. 3, p. 138–146, 2014.

MORRISON, J.; AGUIRRE, S.; FERNANDEZ-SESMA, A. Innate immunity evasion by dengue virus. *Viruses*, v. 4, n. 3, p. 397–413, 2012.

MURI, E. M. F. Proteases virais: Importantes alvos terapeuticos de compostos peptidomimeticos. *Quimica Nova*, v. 37, n. 2, p. 308–316, 2014.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. *Annual Review of Immunology*, v. 29, n. 1, p. 587–619, 2011.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*, v. 5, n. 1, p. 299–309, 2013.

NEELIKA, G.; OGG, G. S. T cell responses in dengue viral infections. *Journal of Clinical Virology*, v. 58, n. 4, p. 605–611, 2013.

NEMÉSIO, H.; PALOMARES-JEREZ, F.; VILLALÁIN, J. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: Membranotropic regions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1818, n. 11, p. 2818–2830, 2012.

PLUMMER, E. M.; SHRESTA, S. Mouse models for dengue vaccines and antivirals. *Journal of Immunological Methods*, v. 410, p. 34–38, 2014.

PUCCIONI-SOHLER, M.; ROSADAS, C. Avanços e novos aspectos na neuropatogênese da dengue. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 73, n. 8, p. 698–703, 2015.

REKHA, M. M. et al. A short review on Zika Virus past , present strategies and future prospectives. v. 4, n. 7, p. 21–24, 2016.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Partial maturation: An immune-evasion strategy of dengue virus? *Trends in Microbiology*, v. 19, n. 5, p. 248–254, 2011.

RUSSELL, P. K. et al. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)*, v. 99, n. 2, p. 285–290, 1967.

SAHU, R. et al. Neurologic complications in dengue virus infection: A prospective cohort study. *Neurology*, v. 83, n. 18, p. 1601–1609, 2014.

SAKOONWATANYOO, P.; BOONSANAY, V.; SMITH, D. R. Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein. *Intervirology*, v. 49, n. 3, p. 161–172, 2006.

SARATHY, V. V et al. A lethal murine infection model for dengue virus 3 in AG129 mice deficient in type I and II interferon receptors leads to systemic disease. *Journal of virology*, v. 89, n. 2, p. 1254–66, 2015.

SCATURRO, P. et al. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 11, p. 1–32, 2015.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology*, v. 96, n. 07, p. 41–101, 2007.

SHRESTA, S. et al. Murine Model for Dengue Virus-Induced Lethal Disease with Increased Vascular Permeability. *Journal of Virology*, v. 80, n. 20, p. 10208–10217, 2006.

SIMMONS, C. P. et al. Early T-Cell Responses to Dengue Virus Epitopes in Vietnamese Adults with Secondary Dengue Virus Infections Early T-Cell Responses to Dengue Virus Epitopes in Vietnamese Adults with Secondary Dengue Virus Infections. *Journal of Virology*, v. 79, n. 9, p. 5665–5675, 2005.

SOLANKI, H. A.; SHANKAR, S. S.; HIMANSHU, A. Dengue as a Druggable Disease *Drug Review*. v. 1, p. 1–19, 2017.

SOLOMON, T. et al. Neurological manifestations of dengue infection. v. 355, p. 1053–1059, 2000.

ST JOHN, A. L. et al. Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase, to dengue virus-induced vascular leakage. *eLife*, v. 2013, n. 2, p. 1–18, 2013.

TAY, M. Y. F.; VASUDEVAN, S. G. Nucleocytoplasmic Trafficking of Dengue Non-structural Protein 5 as a Target for Antivirals. 2018.

TERAMOTO, T. et al. Serotype-specific interactions among functional domains of dengue virus 2 nonstructural proteins (NS) 5 and NS3 are crucial for viral RNA replication. *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 23, p. 9465–9479, 2017.

THEIN, T. et al. Association Between Increased Vascular Nitric Oxide Bioavailability and Progression to Dengue Hemorrhagic Fever in Adults. v. 212, n. September, p. 2015–2018, 2017.

VASSALLO, M. Book of the Month: Medical Ethics and the Elderly. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 97, p. 450–454, 2004.

VAZQUEZ, M. I.; CATALAN-DIBENE, J.; ZLOTNIK, A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine*, v. 74, n. 2, p. 318–326, 2015.

VIONETTE, R. J.; DANSA-PETRETSKI, M. CAPÍTULO 14 1 Interação Patógeno-Vetor: Dengue. p. 1–35, 2012.

WATANABE, S.; CHAN, K. W.; VASUDEVAN, S. Mouse Model of Dengue Virus Infection with Serotypes 1 and 2 Clinical Isolates. *Bio-Protocol*, v. 6, n. 23, p. 1–10, 2016.

WHITEHORN, J.; VAN, V. C. N.; SIMMONS, C. P. Dengue human infection models supporting drug development. *Journal of Infectious Diseases*, v. 209, n. SUPPL. 2, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. *Prevention and Control*, v. 409, n. 3, p. 160, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Handbook for clinical management of dengue. [s.l: s.n.].

XAVIER, A. R. et al. Manifestações clínicas na dengue. Diagnóstico laboratorial. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 102, n. 2, p. 7–14, 2014.

YARO, A. Advances in Dengue Vaccine: A Review Study. *Journal of Human Virology & Retrovirology*, v. 4, n. 3, p. 3–7, 2016.

YAUCH, L. E.; SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Research*, v. 80, n. 2, p. 87–93, 2008.

YE, H.; LI, S.; CHEN, L. Evasion of Innate Immunity by Dengue Virus Non-Structural Proteins through Interfering with Type I Interferon Production and Jak/STAT Signaling. *Journal of Antivirals & Antiretrovirals*, v. 09, n. 01, p. 2016–2017, 2017.

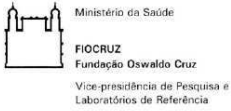
YONG, Y. K. et al. Aberrant monocyte responses predict and characterize

dengue virus infection in individuals with severe disease. *Journal of Translational Medicine*, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2017.

ZOLINI, G. P. et al. Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. *Journal of neuroinflammation*, v. 11, p. 20, 2014.

ZOMPI, S.; HARRIS, E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses*, v. 4, n. 1, p. 62–82, 2012.

9. ANEXOS



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-7/16

Certificamos que o protocolo (P-7/15-4), intitulado "Resposta imune a dengue virus em modelo murino", sob a responsabilidade de MARCO ANTONIO DA SILVA CAMPOS, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 29/02/2020 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 88 Machos de C57BL/6, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000.

Mus musculus

- 88 Machos de 129 TRIF, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000.

Mus musculus

- 88 Machos de MYD-I-, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000.

Mus musculus

- 88 Machos de TLR2/TLR9 KO, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 88 Machos de 129 Sv/Ev, Idade: 7 Semana(s), Peso: 20,0000.

Rio de Janeiro, 29 de fevereiro de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA


Etelcia M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0483096


Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04828850
29/02/16

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Mangunhins - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882 9121 e-mail: ceua@fiocruz.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 26/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Virulência do Dengue vírus "in vitro" e "in vivo"**", que tem como responsável(is) **Erna Geessien Kroon**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 05/2011**.

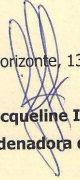
Este certificado expira-se em **11/ 05/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 26/2011**, related to the project entitled "**Virulence of Dengue virus "in vitro" and "in vivo"**", under the supervisors of **Erna Geessien Kroon**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 11, 2011**.

This certificate expires in **May 11, 2016**.

Belo Horizonte, 13 de Maio de 2011.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3489-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpa.ufmg.br

Subcutaneous Model for the Study of Dengue Virus Infection in Immune Competent Mice

Beatriz Senra Santos¹, Natalia Lima Pessoa^{1,2}, Natalia Lucinda^{1,2}, Gustavo Cardoso de Oliveira¹, Thais Souza Silva¹, Ketyllen Reis Andrade¹, Bruno Galvão Filho¹, Marcelle Neves Rocha¹, Alexandre Vieira Machado¹, Pedro Augusto Alves¹, Érica Alessandra Rocha Alves¹, Erna Geessien Kroon^{2*}, Marco Antônio Campos^{1**}

¹Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Belo Horizonte, Brazil

²Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Laboratório de Virologia, Brasília, Brazil

Email: ^{*}marcusso@minas.fiocruz.br

How to cite this paper: Santos, B.S., Pessoa, N.L., Lucinda, N., de Oliveira, G.C., Silva, T.S., Andrade, K.R., Filho, B.G., Rocha, M.N., Machado, A.V., Alves, P.A., Alves, E.A.R., Kroon, E.G. and Campos, M.A. (2018) Subcutaneous Model for the Study of Dengue Virus Infection in Immune Competent Mice. *Journal of Biosciences and Medicines*, 6, 97-110.
<https://doi.org/10.4236/jbm.2018.60101>

Received: March 31, 2018

Accepted: May 21, 2018

Published: May 24, 2018

Copyright © 2018 by authors and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Abstract

Various mouse models to study dengue have been described by different authors, some of them using immunodeficient or some using humanized mice. Our group reported previously a deadly murine model, which used the intracranial inoculum of highly virulent Dengue virus (DENV) in immune competent mouse. Here we present a model of immune competent mouse (C57BL/6), infected subcutaneously by the same highly virulent DENV (DENV3 genotype 1). In this immunocompetent systemic mice model, the cytokine levels and hematological parameters such as total and differential leukocyte and platelets counts, together with weight loss, were considered important monitoring parameters, allowing a better understanding of the systemic human disease. Mice were inoculated subcutaneously and evaluated by the percentage weight variation as well as the clinical signs. Hematological parameters and cytokines levels were measured and viral titration in brain tissue or serum neutralization was performed to confirm mice infection. The subcutaneously DENV inoculated mice showed weight loss after infection, but they did not show any other clinical signs. The leukocytes and platelets decreased after subcutaneous inoculation. The cytokines TNF alpha and IFN gamma increased after infection in mice. The subcutaneous model provided scope for improved understanding of the dengue pathogenesis, as well as possible mechanism for protection to subsequent mouse infected by intracranial route in mice. This model could be used to study the vertebrate immune response and evaluation of drugs or vaccine against dengue virus.

*These authors contributed equally to this work.

Keywords:

Subcutaneous Murine Model, Dengue Disease, Immune Competent Mouse, Cytokines, Innate Immune Response

1. Introduction

Dengue, one of the most prevalent infectious diseases in the 21st century [1], is a mosquito-borne viral disease. Dengue is a febrile disease of acute evolution caused by the dengue virus (DENV) of the *Flaviviridae* family, and it infects humans through the bite of the female hematophagous mosquito *Aedes aegypti* [2]. Patients often develop a sudden high fever after the incubation period. This acute febrile phase usually lasts 2 - 7 days and is often accompanied by several symptoms, such as headaches, chills, retro-orbital pain, and myalgia. Dengue was classified by the World Health Organization as occurring with or without warning signs or as severe dengue [3] [4].

One of the possible warning signs is the impairing of consciousness (neurological disease) caused by DENV, which may include symptoms such as severe headache, neck stiffness, reduced consciousness and seizures. Although not very common to date, neurological disease caused by DENV is more frequently described in the last years and is a severe disease. However, the cause of this neurotulence is still unclear [5] [6] [7] [8] [9]. In animal model, the uses of hematological parameters such as differentiation and counting of total leukocytes, red blood cells, platelets, lymphocytes, neutrophils and monocytes [10] [11] [12] [13] are important disease markers, allowing a better understanding of dengue disease and its response mechanisms in the body of the animals studied [5] [14] [15] [16] [17]. Additionally, cytokines such as IFN gamma, TNF alpha and IL12p70 are used to evaluate the immune response to DENV infection [18] [19] [20].

Three different approaches are found in the literature, focusing on the induction of a human-like disease in any of: 1) immunocompetent mice [6], 2) mice deficient in specific genes that are important for the immune response and are naturally absent or have been removed [17] [21] [22], and 3) immunodeficient mice that had been implanted with human cells [6] [21] [22].

Our group reported previously an intracranial inoculum of a highly virulent DENV in immune competent mouse, causing death [6]. However, this model was very aggressive with the death of the mice in 9 days with neurological signs. Here we present a model of immune competent mouse (C57BL/6) infected subcutaneously mimicking the natural way of infection by the same highly virulent DENV (DENV3 genotype 1) used previously [6] [21]. This allowed the understanding of some additional steps of the pathogenesis, and showed that the subcutaneous infection conferred protection to a second infection by an intracranial *via*.

2. Material and Methods

2.1. Virus

DENV3 genotype 1 (MG20), which is highly virulent for mice, was obtained from virus collection of Laboratório de Virus of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil. It was isolated from a patient presenting neurological manifestations of dengue and death [23]. The virus used in this study was a virus with only 6 passages in C6/36 cells, thus maintaining the initial highly virulent characteristics of the virus.

2.2. Cells

C6/36 cells is a continuous lineage obtained from *Aedes albopictus* (ATCC, number CRL-1660) larvae and were cultivated on Leibovitz (L-15) medium (Gibco, USA), containing ciprofloxacin at 10 µg/ml and fetal bovine serum (FBS) at 10% (Cultilab, Brazil). Cells were maintained in BOD at 28°C. For the passage of cell monolayers, culture medium was discarded and cells washed with phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2 and then homogenized in L15 medium (Gibco, USA) and distributed into 25 or 75 cm² culture flasks. C6/36 cells were used to study viral replication. BHK-21 cells derived from hamster kidney (ATCC, number CCL-10) were cultivated on Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA), containing gentamicin at 50 µg/ml, penicillin at 100 IU/ml, amphotericin B at 5 µg/ml and FBS at 5%. Cells were maintained in a CO₂ cell incubator at 37°C. BHK cells were used in viral titration protocol and serum neutralization test.

2.3. Mice

Immune competent C57BL/6 mice were provided by animal facilities of Instituto René Rachou-Fiocruz-MG (IRR). The animals, all males, were 8 weeks old.

2.4. Animal Research

This project was submitted to and approved by the Ethical Committee of Animal Handling (CEUA) from Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brazil (LW-7/16), see annex 1. This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Brazilian National Council for Control of Animal Research (CONCEA).

2.5. Criteria Used to Determine Mice Euthanasia

In previous publication we demonstrated that mice inoculated by intracranial route with highly virulent virus presented clinical signs of disease as loss of weight, lethargy, ruffled fur, hunched posture and paralysis of paws, and since then it has been established by our group that the mice with these clinical signs should be immediately euthanized [6]. These criteria were described in the project submitted and approved by the Ethical Committee of Animal Handling described above.

Additionally the infected or mock mice were euthanized at the end of each experiment. No animal died before meeting the euthanasta criteria or before the end of the experiment.

2.6. Animal Welfare

Animals were maintained in micro isolators on ventilated shelves at IRB's animal facilities, where the temperature ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity, ventilation, sanitation and illumination were controlled. Food and water were provided *ad libitum*. Mice received subcutaneous inoculum (SC) containing 5×10^4 p.f.u. of DENV 3 genotype I (MG20) on a final volume of 100 μL . The animals were monitored daily for evaluation of clinical signs and survival curve and weighed daily. All cages had igloos as environmental enrichment for animals. All those involved in the handling of the animals were previously trained by the IRB's animal facilities.

2.7. Models of Infection

Subcutaneous infection (SC)—the mice received inoculum of 5×10^4 p.f.u. of DENV by SC route (inoculum of 100 μL); Intracranial infection (IC)—the mice received inoculum of 400 p.f.u. of DENV by IC route (inoculum of 10 μL); Subcutaneous infection followed by intracranial infection (SC-IC)—the mice received 5×10^4 p.f.u. of virus (inoculum of 100 μL) and after 14 days received new infection by IC route with 400 p.f.u. of virus (inoculum of 10 μL); Mock mice—the mice received only inoculum with the C6/36 cell supernatant. Six mice were used in each group.

2.8. Viral Titration

BHK-21 cells were used to titer viral stocks and the organs of infected mice. Cell monolayer, 5×10^5 BHK-21 cells were implanted in 6 wells plates with DMEM supplemented with 5% of heat inactivated FBS (Cultilab, Brazil) and antibiotics, and incubated for 24 hours at 37°C in a 5% CO_2 cell incubator. Medium was discarded and cell monolayer was washed once with PBS. Then 400 μL of serial dilutions (using 10^{-1} to 10^{-7} dilutions) of virus to be titrated were added in each well, leaving a well for cell control. After one hour of adsorption the medium was removed and 2 mL/well of DMEM, containing 1% of carboxymethylcellulose (CMC) (Sigma, Germany) and 2% of FBS was added. Cells were incubated at 37°C for 6 days at a cell incubator with 5% of CO_2 . After 6 days of observation under a microscope, cells were fixed for 1 hour with formaldehyde at 3.7% diluted in PBS for subsequent staining with crystal violet at 1% solution for 20 minutes. The number of lysed plaques were counted for titer determination in plaque forming units per milliliter (p.f.u./mL).

2.9. Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT₅₀) for DENV-3

The adapted protocol from Russell *et al.* [24] was used for serum neutralization

test. BHK-21 cells were plated at the concentration of 5×10^4 cells/ml in 24 well plate (1 mL/well) with DMEM supplemented with 5% of FBS and antibiotics and incubated for 24 hours at 37°C in a 5% CO₂ cell incubator. Sera were inactivated at 56°C for 30 minutes and diluted (1:10, 1:20, 1:40, 1:80) in DMEM supplemented with 1% FBS and incubated with the same volume of diluted virus (50 p.f.u./well) for 1 hour at room temperature. The neutralized sera were added to BHK-21 cells in plates for one hour for adsorption. The serum was removed and 1 mL DMEM supplemented with 5% of FBS and 1% CMC was added in each well and was incubated at 37°C for 7 days in a 5% CO₂ cell incubator. After seven days the cells were fixed for one hour with 3.7% formaldehyde diluted in PBS and subsequently stained with crystal violet (1%) for 20 minutes. Plaques were counted in wells that received negative serum and, in the wells, which received the test sera. The PRNT₅₀ index was calculated by the highest serum dilution capable of reducing the total number of plaques by 50%, relative to the control.

2.10. Cytokine Level Detection

To measure the cytokine levels in brain tissues were collected, macerated and stored on a protease inhibitor solution (complete, Mini, EDTA-free) and 25 µL/well of organ macerate or 25 µL of each dilution of standard (including the negative control) were added into a 96 well V-bottom plate. Following, 18 µL/well of the CBA mix (Inflammation BD™ Cytometric Bead Array (CBA) mouse kit [25], USA) was pipetted. Then, 15 µL of PE detection reagent was added and it was incubated for 2 hours protected from light. After the incubation period, 100 µL of wash buffer was added to each well and centrifuged at 200 g for 5 minutes. Supernatant was discarded and 150 µL/well of wash buffer was added to wash the beads. Samples were read in the FACScan (BD Biosciences) and the analysis of the CBA was done in the CellQuest software (BD Biosciences), with the results represented in pg/mL. The cytokine kinetics was chosen based on innate (6 and 12 h.p.i. hours post infection) and adaptive immune response (8 d.p.i. days post infection) in the host [19] and on the time at which the weight loss begins.

2.11. Real-Time PCR

Real-Time PCR was performed to measure levels of virus genomic RNA expression in brain and liver [26] [27]. RNA extracted with TRIzol® reagent was treated with DNase prior to further reverse transcription. Protocol of RNA treatment with DNase was according to the BQ1 RNase-Free DNase kit instructions (Promega). Procedure for reverse transcription (RT) was performed according to the protocol of the manufacturer (Promega Corporation, USA). For the qPCR, 2.5 µL of the cDNA obtained from the RT were used. Each primer (0.2 µL) was aliquoted at 10 µM; 5.0 µL of Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems) and 2.0 µL of RNase-free water (Ultra-Pure Distilled Water-Invitrogen) with a final volume of 10.0 µL/well was used in a 384 wells plate

containing SYBR Green I marker, AmpliTaq Gold DNA Polymerase (2 units for reaction), dNTP, buffer and passive reference dyestuff ROX, in Applied Biosystems VILA™ 7 apparatus. Amplifications were used with 40 cycles of 95°C for 30 seconds and 60°C for 1 minute, preceded by 95°C for 3 minutes. After the reaction, the amplified specificity was observed, conferring the dissociation temperature (TM) given by the dissociation curve, specific for the target transcript. The following oligonucleotides were used in the reactions: HPRT—hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Reverse: 5'-GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG-3'; Forward: 5'-GTT GGA TAG AGG CCA GAC TTT-GTT G-3'); DENV-5' UBT DENV Non-coding 5' terminal region of the DENV: (Reverse: 5'-TCC GTT GGT TGT TCA TCA GA-3'; Forward: 5'-YCG GAA GCT TGC TTA ACG TAG-3'). Relative quantification methodology was used to analyze the data. Expression of the genomic RNA was normalized to the expression level of the constitutively expressed HPRT gene.

2.12. Blood Cells Count

Immediately after anesthesia, blood samples were obtained through brachial plexus and were added on microtainer tubes coated with EDTA (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, USA). Red blood cells (diluted in PBS 1:200), platelets (diluted in ammonium oxalate 1:100) and leukocytes (diluted in Turk's blue solution 1:20) counts were performed manually on a Neubauer chamber and monocytes, neutrophils and lymphocytes were counted manually on a previously fixed and stained blood smear slide.

2.13. Statistical Analysis

The infected groups were compared to the control group using the Mann-Whitney test for non-parametric samples and T-test for parametric samples. Statistical analyses were performed utilizing the statistical software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Impact on Weight after Inoculation of DENV3 Genotype 1, By Subcutaneous (SC) Route and Protection to a Second Challenge by Intracranial (IC) Route of Infection in Immune Competent Mice

The C57BL/6 mice were inoculated via intracranial (IC) route with 4×10^6 p.f.u. of DENV 3 genotype 1 (Figure 1). Clinical signs (weight loss, pilo-erection, hunched posture and hind limb paralysis) were evaluated daily, confirming the susceptibility to neuro-infection of mice by via intracranial (IC) route which developed neuro-encephalitis and death within 9 days after infection, as reported previously [6]. In another model, the same highly virulent DENV and the same strain of mice used in previous studies but inoculated subcutaneously (SC)

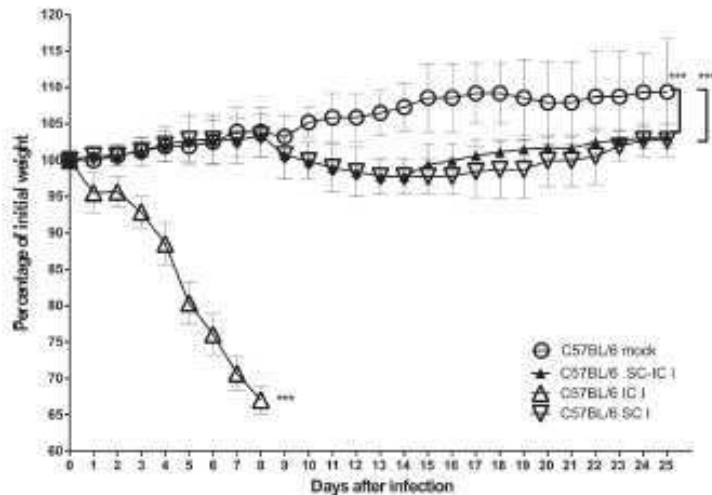


Figure 1. Impact on weight of immune competent mice (C57BL/6) after subcutaneous inoculum of highly virulent DENV. Four groups of mice were used in this experiment: mock mice, subcutaneously infected mice (C57BL/6 SC), subcutaneously intracranially infected mice (C57BL/6 SC-IC), and mice infected by IC route (C57BL/6 IC), to compare the impact on the survival of both types of inoculums. *** $p < 0.0001$ when compared C57BL/6 mock \times C57BL/6 SC, C57BL/6 mock \times C57BL/6 SC-IC on days 15–23 after infection and C57BL/6 mock \times C57BL/6 IC on days 4–8 after infection using t test. d.p.i. = days post infection. Figure representative of three experiments with similar results.

instead IC. This subcutaneously (SC) infection was performed with 5×10^4 p.f.u. and the mice were evaluated daily for the appearance of clinical signs of the disease during the next 25 days (Figure 1).

The infected mice presented a percentage variation of weight gain lower than the uninfected ones. In this model of infection, the animals did not show pilo-erection, hunched posture or hind limb paralysis, and no mouse died, but there was weight loss in infected mice compared to uninfected mice. The infected mice presented this weight loss from day 10 post infection and regained weight from day 18 after infection, maintaining that gain until the end of the experiment.

Firstly, a SC infection was performed with 5×10^4 p.f.u. and on day 14 after this infection, a second infection, now via IC, was performed with 4×10^3 p.f.u. of highly virulent DENV. The variation of weight gain between the infected and the non-infected mice were similar to that in the SC infection and mock SC only. The mock curve was performed with mean of the weights of the mice inoculated separately with C6/36 cell supernatants by the three routes (SC, IC and SC-IC), because the weights were very similar.

To confirm virus effective infection via IC, SC and SC-IC, virus brain titration, with inoculum via IC or via SC or via SC-IC or serum neutralization via inoculum SC, of infected mice, were performed (Table 1) and also Real Time PCR was performed to confirm the presence of genomic RNA in the brain (infected via IC or SC-IC) or in the liver of the animals infected by SC (Figure 2).

The results confirm that the virus replicated inside the brain in the IC or SC-IC or in the serum via SC infection with a titer of 1.2 to 1.4×10^4 p.f.u. at the 5th day post infection and 29×10^4 p.f.u. at the seventh day post infection (Table 1). There was an antibody response against DENV in the SC infection at a titer of 1:80 per ml. at the 60th day post infection (Table 1).

3.2. Changes in Hematological Parameters

Leukopenia was observed in subcutaneously infected mice on the 8th day after infection when compared to uninfected animals (Figure 3(a)). There was no significant difference in erythrocytes counts in mice (Figure 3(b)) in any of the times studied when compared to the uninfected ones. Figure 3(c) shows a decrease in the number of platelets at all times studied in the infected mice when compared to the uninfected mice.

Table 1. Virus titer and serum neutralization.

Virus titer p.f.u. $\times 10^4$ (per mg of brain, IC)	Virus titer p.f.u. $\times 10^4$ (per mg of brain, SC-IC)	Virus titer p.f.u. $\times 10^4$ (per mg of serum, SC)	Serum neutralization (SC)
0 dpi	-	-	-
3 dpi	-	-	0 dpi < 20
5 dpi	1.2 (0.19)	1.4 (0.19)	60 dpi > 80
7 dpi	29 (1.7)	30 (1.7)	-

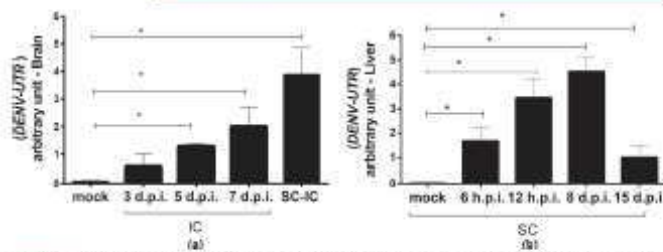


Figure 2. Detection of DENV mRNA level produced in C57BL/6 mice. (a) C57BL/6 mice were infected by intracranial route (IC), and euthanized at 3, 5 and 7 days after infection, or the C57BL/6 mice were infected by via subcutaneous and after 14 days were infected again via intracranial and euthanized 7 days after the second infection (SC-IC). Mock animals received inoculum of C6/36 cell supernatant and after 14 days one more inoculum of C6/36 cell supernatant. (b) C57BL/6 mice were infected through via subcutaneous and euthanized at 6 (6 h.p.i.) or 12 hours (12 h.p.i.) or 8 (8 d.p.i.) or 15 days (15 d.p.i.) after infection. Mock animals received inoculum of C6/36 cell supernatant. Statistical analyses were performed with Mann-Whitney non-parametric test. $p < 0.05$.

For virus titration in the brain after IC inoculation with 400 p.f.u. of DENV or with C6/36 cell supernatant (mock), C57BL/6 mice were euthanized for removal of the brain on days 3, 5 and 7 post-infection. For the titration of the virus in the brain after SC-IC infection, C57BL/6 mice were inoculated via SC with 5×10^6 p.f.u. of DENV or with C6/36 cell supernatant (mock) and 14 days after this infection, the mice were inoculated again via IC with 400 p.f.u. of DENV or with C6/36 cell supernatant (mock) and mice were euthanized for removal of the brain on days 3, 5 and 7 after this second inoculation. For virus titration in the serum, after inoculation via SC with 5×10^6 p.f.u. of DENV or with C6/36 cell supernatant (mock), the serum was collected 3, 5 and 7 days after inoculation. For the seroneutralization test (PRNT50), C57BL/6 mice were inoculated via SC with 5×10^6 p.f.u. of virus or with C6/36 cell supernatant (mock) and serum samples were collected 60 days after inoculation. d.p.i. = days after infection.

There was no difference in lymphocytes counts in infected mice, when compared to noninfected mice (Figure 4(a)). A decrease in the monocytes count was observed 6 hours after infection in mice, when compared to non-infected mice (Figure 4(b)). In the infected mice there was no difference in the neutrophils count in comparison to the uninfected mice, at the times studied (Figure 4(c)).

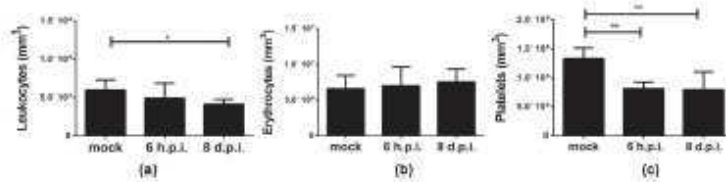


Figure 3. Leucocytes, red blood cells and platelets count after DENV subcutaneous inoculation. Mice received subcutaneous inoculum of 5×10^6 p.f.u. of DENV, were euthanized 6 hours or 8 days after infection and blood were collected in EDTA tubes for leukocyte, red blood cells and platelets count. h.p.i. = hours post infection; d.p.i. = days post infection. Mock: mice received C6/36 cell supernatant inoculum. Statistical analyses were made with Mann-Whitney non-parametric test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (a) mice leukocytes, (b) mice red blood cells, (c) mice platelets.

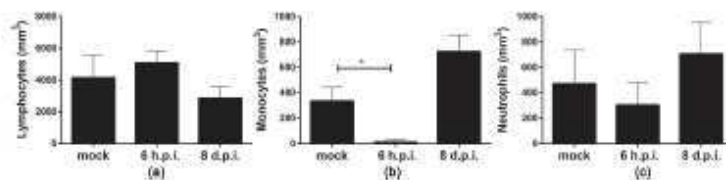


Figure 4. Lymphocytes, monocytes and neutrophils count after DENV infection. Mice received subcutaneous inoculum of 5×10^6 p.f.u. of DENV and were euthanized 6 hours or 8 days after infection and blood were collected in EDTA tubes for lymphocytes, monocytes and neutrophils count. h.p.i. = hours post infection; d.p.i. = days post infection. Mock: the mice received C6/36 cell supernatant inoculum. Statistical analyses were made with Mann-Whitney non-parametric test. * $p < 0.05$. (a) mice lymphocytes, (b) mice monocytes, (c) mice neutrophils.

3.3. Cytokine Levels Increase in the Liver and Spleen of Mice after Subcutaneous Infection

An increase of TNF alpha level in mice spleen, 6 hours after subcutaneous DENV inoculation was observed, when compared to the uninfected group (Figure 5(a)). An increase of TNF alpha level in mice liver was observed 6 and 12 hours after subcutaneous DENV infection, when compared to the uninfected group (Figure 5(b)). The cytokine IL-12p70 in the liver of infected mice was similar to cytokine level found in uninfected mice at all times studied (Figure 5(c)). On the other side, IFN gamma in the liver of mice 6 and 12 hours after infection with DENV was increased, when compared to the uninfected mice (Figure 5(d)). In the spleen no IL12-p70 and IFN gamma were detected (data not shown).

4. Discussion

Recently, our group presented an experimental model of intracranial (IC) infection with a highly virulent DENV, to study dengue disease with neurologic complications [5] [6]. Here, the intracranial inoculation performed in this work was to compare the weight loss observed with this kind of infection previously described [5] [6] with the weight loss obtained after the subcutaneous inoculation,

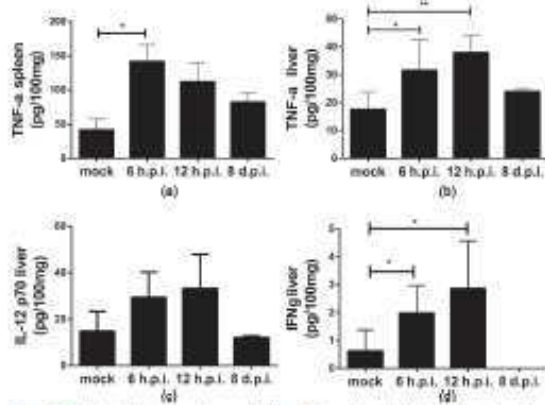


Figure 5. Cytokines levels on spleen and liver of mice, after DENV inoculum by subcutaneous route. Mice were inoculated via subcutaneous, with 5×10^6 p.f.u. of DENV, euthanized with 6 or 12 hours or 8 days after infection and organs were collected and stored in a protease inhibitor solution. Cytokines were evaluated by flow cytometry beads. (a) TNF alpha levels on mice spleen. (b) TNF alpha levels on mice liver. (c) IL12 p70 on mice liver. (d) IFN gamma on mice liver. Mock: the mice received C6/36 cell supernatant inoculum. h.p.i: hours post infection; d.p.i: days post infection. Statistical analyses were made with Mann-Whitney non-parametric test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

using the same mice sample and the same highly virulent virus. The subcutaneous inoculation is an additional model, using immune competent mice infected with highly virulent virus to study the immune response against dengue, looking for a less aggressive model, when compared to the intracranial inoculation model. The subcutaneous inoculation is also closer to how infections occur in humans, who are infected by mosquito's bites in the skin. While our model is not necessarily better than the humanized mice model, it is an additional model, which is less aggressive than the humanized mice model. And since a loss of weight and subsequent recovery and stabilization of the animals were observed in the subcutaneous infection, although no classic clinical signs occurred, we believe that this model could be useful for the study of dengue disease, for a better understanding of the pathogenesis of the disease. Differently from clinical signs, after SC infection of mice with DENV, hematological and immunological changes of the host were observed, what represents a way to study experimental dengue in mouse. Surprisingly, previous infection of mouse by SC conferred resistance to a subsequent IC infection (Figure 1). It seems that the subcutaneous infection prevents the mice from displaying an exacerbated immune response, resulting in the animal survival. The reason also could be that the antibody neutralization production, as presented in Table 1, could impair the lethality of this highly virulent DENV in the second infection by via IC. In our mouse experimental SC model, the mice suffer a thrombocytopenia (Figure 3(c)) and monocytopenia (Figure 4(b)) since the sixth hour after the infection, besides a leukopenia (Figure 3(a)) from day 8 after infection. Thrombocytopenia occurs in 80% to 100% of the dengue patients and leukopenia are a human dengue characteristic also [2] [3] [8] [9] [28] [29]. We showed in our model, that TNF alpha in the spleen and IFN gamma in the liver of immune competent mice 6 hours after infection with DENV have increased (Figure 5(a) and Figure 5(d), respectively), showing the importance of these cytokines to the host defense against a highly virulent dengue virus inoculated by via subcutaneous. It has been reported that the cytokines IFN gamma and TNF alpha are important in the fight against dengue [7] [30]. The model presented in this work presented some but not all of the human manifestations, as all the other models already mentioned in the literature, but it is an additional model, which uses immunocompetent mice, being infected by the subcutaneous via with a highly infective DENV. This model is an additional interesting model for the study of immune responses to dengue virus.

5. Conclusion

The study presents an immune competent mice model infected by via subcutaneous with highly virulent DENV. In this model, the cytokine levels and hematological parameters such as global and differential leukocyte and platelets counts, together with weight loss, were considered important parameters, allowing a better understanding of the disease, because these changes occur normally in human beings. Although there are other murine models for the study of

dengue, none of them shows all characteristics of human disease. Therefore, more than one model to cover several aspects of the disease is necessary. Our model proved to be an effective and less invasive option for studying the effects of highly virulent DENV on the immune response. This model could be used to study the vertebrate immune response, drugs or vaccine against dengue virus as it reproduces some of the clinical symptoms of patients.

Acknowledgements

The authors thank the program for technological development in tools for health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

Fundings

The FAPES VU/Fiocruz/CNPq (403521/2008-4) to MAC; CNPq-MCTIC-CNPq/MEC-CAPE/MS-Dedu/FNDCT, Prevenção e Combate an vírus Zika (440911/2016-8) to EGK; FAPEMIG-PPM (00452-17) to EGK; INCTV/FAPEMIG (000077-09) to MAC. AVM, EGK (307423/2015-8) and MAC (307285/2015) are fellows from CNPq.

References

- [1] World Health Organization (WHO). (2016) Technical Handbook for Dengue Surveillance, Dengue Outbreak Prediction/Detection and Outbreak Response ("Model Contingency Plan"). World Health Organization, Geneva.
- [2] Xavier, A.R., Freitas, M.S., Loureiro, F.M., Borghi, D.P. and Kassus, E. (2014) Manifestações clínicas na dengue: diagnóstico laboratorial. *Brazilian Journal of Medicine*, 102, 7-14.
- [3] World Health Organization (WHO). (2012) Handbook for Clinical Management of Dengue. World Health Organization, Geneva.
- [4] World Health Organization (WHO). (2009) Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. World Health Organization, Geneva.
- [5] Ferreira, G.P., Figueiredo, L.B., Coelho, L.F.J., Junior, P.A.S., Castão, A.R., Ferreira, P.C.P., Bonjardim, C.A., Arantes, R.M., Campos, M.A. and Kroon, E.G. (2010) Dengue Virus 3 Clinical Isolates Show Different Patterns of Virulence in Experimental Mice Infection. *Microbes and Infection*, 12, 546-554. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.007>
- [6] Souza, E.P.R., Silva, E.G., Rocha, E.S., Figueiredo, L.B., Almeida Leite, C.M., Arantes, R.M.F., Assis, J.S.G., Ferreira, G.P., Oliveira, J.G., Kroon, E.G. and Campos, M.A. (2013) Nitric Oxide Synthase Expression Correlates with Death in an Experimental Mouse Model of Dengue with CNS Involvement. *Virology Journal*, 10, 267. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-267>
- [7] Solomon, T., Dung, N.M., Vaughn, D.W., Koen, R., Thi, L., Thao, T., Saengsakulrach, B., Loan, H.T., Day, N.P., Farrar, J., Myint, K.S., Warren, M.J., James, W.S., Nisalak, A. and White, N.J. (2000) Neurological Manifestations of Dengue Infection. *Lancet*, 355, 1053-1059.
- [8] Sahu, R., Verma, R., Jain, A., Garg, R.K., Singh, M.K., Malhotra, H.S., Sharma, P.K. and Parhar, A. (2014) Neurologic Complications in Dengue Virus Infection: A Prospective Cohort Study. *Neurology*, 83, 1601-1609.

- <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000935>
- [9] Kulkylal, A.S. (2017) Dengue Haemorrhagic Encephalitis: Rare Case Report with Review of Literature. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11, 10-12.
 - [10] Barbara, J.L. (1995) Blood Sampling and Film Preparation. Oxford, United Kingdom.
 - [11] Hamana, F.G.J.H. (1973) As hemácias e suas precursoras. In: Atlas de citologia hematológica. Rio de Janeiro, Brasil.
 - [12] Hamana, F.G.J.H. (1973) Granulócitos, monócitos, megacariócitos. In: Atlas de citologia hematológica. Rio de Janeiro, Brasil.
 - [13] Hamana, F.G.J.H. (1973) Linfócitos, plasmócitos e suas precursoras. In: Atlas de citologia hematológica. Rio de Janeiro, Brasil.
 - [14] Zompi, S. and Harris, E. (2012) Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4, 62-82. <https://doi.org/10.3390/v4010062>
 - [15] Connell, K.E.O., Mikkola, A.M., Stapanek, A.M., Vernet, A., Hall, C.D., San, C.C., Yildirim, E., Staropoli, J.F., Lee, I.T. and Brown, D.E. (2015) Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research. *American Association for Laboratory Animal Science* 65, 96-113. <https://doi.org/10.1128/VL00062-06>
 - [16] Shrestha, S., Sharar, K.L., Prigozhin, D.M., Beatty, P.R. and Harris, E. (2006) Murine Model for Dengue Virus-Induced Lethal Disease with Increased Vascular Permeability. *Journal of Virology*, 80, 10208-10217. <https://doi.org/10.1128/JVI.00062-06>
 - [17] Zellweger, R.M. and Shrestha, S. (2014) Mouse Models to Study Dengue Virus Immunology and Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, 5, 1-9.
 - [18] Costa, V.V., Fagundes, C.T., Souza, D.G. and Teixeira, M.M. (2013) Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection: Protection versus Disease Induction. *American Journal of Pathology*, 182, 1950-1961. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.037>
 - [19] Kenneth, M., Paul, T. and Walpori, M. (2010) Imunobiologia de Janeway. Rio Grande do Sul, Brasil.
 - [20] Palomino, D.C.T. and Maril, L.C. (2015) Chemokines and Immunity. *Hospital Brasileira de Otorrinolaringologia*, 13, 469-473. <https://doi.org/10.1590/S1679-43082015003438>
 - [21] Campos, M.A., Souza, K.P.R., Oliveira, D.B. and Kroon, E.C. (2016) Neurotropic Dengue Virus Infections. In: *Neurotropic Viral Infections*, Springer International Publishing, Cham, 259-272. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31133-1_10
 - [22] Akhtia, E. (2014) Humanized Mice for Studying Human Immune Responses and Generating Human Monoclonal Antibodies. *Mikrobiology Spectrum*, 2.
 - [23] Huetredo, L.H., Cecilio, A.H., Ferreira, G.P., Drumond, S.P., Oliveira, J.G., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P. and Kroon, E.C. (2008) Dengue Virus 3 Genotype 1 Associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 5, 314-316.
 - [24] Russell, P.K., Nisalak, A., Sukhavachana, P. and Vivona, S. (1967) A Plaque Reduction Test for Dengue Virus Neutralizing Antibodies. *The Journal of Immunology*, 99, 285-290.
 - [25] Camilla, C., Defoort, J.P., Delage, M., Auer J.Q.J., Lary, T., Hametk, E., Prati, S., Casano, H., Martin, M. and Fort, V. (1998) A New Flow Cytometry-Based Multi-Assay System. I. Application to Cytokine Immunoassays. *Cytometry. Supplement*, 8, 132.
 - [26] Stordeur, P., Prullin, L.F., Cracian, L., Zhou, L., Schandené, L., De Lavarelle, A.,

- Goriely, S. and Goldman, M. (2002) Cytokine mRNA Quantification by Real-Time PCR. *The Journal of Immunology Methods*, 259, 55-64. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00489-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00489-6)
- [27] Gublett, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. and Mathies, C. (2001) An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods*, 25, 386-401. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261>
- [28] Lye, D.C., Archuleta, S., Syed-Omar, S.F., Low, J.G., Oh, H.M., Wei, Y., et al (2017) Prophylactic Platelet Transfusion plus Supportive Care versus Supportive Care alone in Adults with Dengue and Thrombocytopenia: A Multicentre, Open-Label, Randomised, Superiority Trial. *The Lancet*, 389, 1611-1618. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30259-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30259-6)
- [29] Sarathy, V.V., White, M., Li, L., Gorder, S.B., Pyles, R.B., Campbell, G.A., et al (2015) A Lethal Murine Infection Model for Dengue Virus 3 in AG129 Mice Deficient in Type I and II Interferon Receptors Leads to Systemic Disease. *Journal of Virology*, 89, 1254-1266. <https://doi.org/10.1128/JVI.01320-14>
- [30] Neebha, C. and Ogg, G.S. (2013) T Cell Responses in Dengue Viral Infections. *Journal of Clinical Virology*, 58, 605-611. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.023>