



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**NEUROADAPTAÇÃO DE VÍRUS DENGUE EM MODELO MURINO:
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES**

DAISY MARIA STROTTMANN

CURITIBA
MARÇO/2008

DAISY MARIA STROTTMANN

**NEUROADAPTAÇÃO DE VÍRUS DENGUE EM MODELO MURINO:
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Dra. Claudia N. Duarte dos Santos

CURITIBA

2008

Aos meus amados pais, Ricardo e Jane e ao Cristiano que com carinho, amizade e compreensão me encorajaram e me incentivaram em todas as situações ao longo do mestrado, abdicando do pouco tempo que temos de convívio em prol da realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ricardo e Jane Strottmann, pela sólida formação dada até minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este mestrado, meus eternos agradecimentos.

À Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos pela oportunidade de participar da equipe do seu laboratório, pela orientação científica, pela sua disponibilidade irrestrita e confiança para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Samuel Goldenberg, Dr. Marco Aurélio Krieger e Dr. Stenio P. Fragoso pela oportunidade de fazer parte da equipe do IBMP.

Aos eminentes integrantes da Banca Examinadora, Dr. Ricardo Galler e Dr. Alejandro C. Dominguez, pela revisão criteriosa e valiosos comentários apresentados ao presente trabalho.

Aos colegas do laboratório, Ana Luiza Pamplona Mosimann, Camilla Nascimento da Costa, Eleonora Campos, Giovanni Augusto C. A. Mazzarotto, Guilherme Ferreira Silveira, Juliano Bordignon, Luana de Borba, Marina Reus Tassi de Araujo, Mário Hüttener Queiroz, Meri Bordignon Nogueira, Sonia Mara Raboni, Suzana Carstensen e Vanessa Stella pelo acolhimento e companheirismo. A vocês que me apoiaram e me auxiliaram em todas as situações ao longo do desenvolvimento dos experimentos e tornaram agradável o nosso ambiente de trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Maurilio José Soares pelo auxílio, paciência e orientação nos experimentos de microscopia eletrônica.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e sua equipe pela disponibilidade para a realização das análises ultra-estruturais.

À Dr. Lúcia Noronha da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC) e sua equipe pela colaboração com os experimentos e análises histológicas.

Ao Dr. Christian M. Probst pelo auxílio na elaboração da estrutura gráfica da proteína NS3 do vírus da dengue.

Aos colegas Nilson José Fidêncio, Janaína Soares da Silva, Vanessa Martins dos Santos e Paulo Arauco pelo auxílio técnico. Agradeço também o auxílio dos colegas Edilaine Azevedo e Luiz Casarotto.

A todos os amigos do IBMP, pelas trocas de experiências num ambiente agradável e de amizades.

Ao meu orientador de iniciação científica, Dr. Luiz Carlos Kreutz, pelo incessante incentivo para a busca do conhecimento e aperfeiçoamento profissional, meus sinceros agradecimentos.

A todos aqueles que, embora não nomeados, contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desta dissertação.

Ao CNPq, FIOCRUZ e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Ao TECPAR pela concessão do espaço do biotério.

Daisy Maria Strottmann

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURA.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A dengue	1
1.2 O mosquito vetor e o ciclo de transmissão.....	4
1.3 O vírus.....	7
1.3.1 Estrutura viral e organização genômica	8
1.3.2 O ciclo viral.....	13
1.4 Patogênese	17
2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Soluções e tampões.....	23
3.2 Meios de cultura.....	24
3.3 Linhagens celulares.....	24
3.4 Animais de experimentação.....	24
3.5 Cepas virais.....	25
3.6 Histórico de passagens das cepas virais.....	25
3.7 Neuroadaptação de vírus dengue em modelo murino.....	26
3.8 Titulação viral por imunodeteção de foco (FIA).....	27
3.9 Caracterização genômica dos vírus neuroadaptados.....	28
3.9.1 Preparação do RNA viral.....	28
3.9.2 Reação de <i>transcriptase</i> reversa (RT).....	29
3.9.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	29
3.9.4 RT/PCR a partir de amostras de RNA viral sem CAP e ligado nas extremidades 5'/3' não traduzida (UTR) do genoma.....	31
3.9.5 Seqüenciamento nucleotídico e análise dos dados de seqüência.....	32
3.10 Estrutura gráfica de proteína NS3 do vírus da dengue.....	33
3.11 RT/PCR quantitativa em tempo real.....	33
3.12 RT/ <i>Nested</i> -PCR.....	35
3.13 PCR genérico para flavivírus.....	36
3.14 Reação de PCR para identificação dos vírus herpes simples (HSV) e varicella-zoster (VZV).....	37
3.15 Análise histopatológica e ultra-estrutural dos vírus neuroadaptados... ..	38
3.15.1 Histopatologia.....	38
3.15.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	39
3.15.3 Imunocitoquímica ultra-estrutural.....	40
3.16 Obtenção de estoque viral.....	41
3.16.1 Isolamento viral.....	41
3.16.2 Imunofluorescência indireta (IFI).....	42

3.16.3 Purificação viral em gradiente de sacarose.....	43
3.17 Caracterização biológica do vírus neuroadaptado FGA/NA P6.....	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Caracterização biológica dos vírus dengue durante o processo de neuroadaptação em modelo murino.....	44
4.1.1 Neuroadaptação do vírus FGA/89.....	44
4.1.2 Caracterização genômica dos vírus FGA/NA.....	47
4.2 Neuroadaptação do vírus BR/01-MR.....	54
4.3 Análise estrutural e ultra-estrutural dos vírus neuroadaptados.....	64
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Distribuição dos casos de dengue por estado e área de incidência, Brasil, 2007. Fonte: Dados do Ministério da Saúde, 2007.....	4
Figura 1.2 -	Distribuição global do mosquito vetor da dengue, <i>A. aegypti</i> . Fonte: MACKENZIE et. al., 2004.....	5
Figura 1.3 -	Ciclo de infecção do vírus da dengue no hospedeiro invertebrado. Fonte: GUBLER, 1998.....	6
Figura 1.4 -	Organização do genoma do vírus da dengue. Fonte: Adaptado de PHILLIPE DESPRÈS.....	8
Figura 1.5 -	Estrutura do ectodomínio da proteína de envelope na partícula madura do vírus da dengue. Fonte: Adaptado de MODIS et al., 2004 e WHITEHEAD et al., 2007.....	11
Figura 1.6 -	Mecanismo proposto para a fusão da membrana viral com a membrana endossomal da célula hospedeira. Fonte: MODIS et. al., 2004.....	15
Figura 1.7 -	Ciclo de replicação do vírus da dengue. Fonte: Adaptado de PHILIPPE DESPRÈS.....	16
Figura 1.8 -	Modelo para amplificação dependente de anticorpos da replicação do vírus da dengue. Fonte: WHITEHEAD et. al., 2007.....	18
Figura 4.1 -	Sobrevivência de camundongos durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89.....	45
Figura 4.2 -	Taxa de mortalidade, progênie viral e RNA viral no SNC de camundongos infectados durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89.....	46
Figura 4.3 -	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação independente dos genes que codificam para as proteínas E (1) e NS3 (2 e 3) e para o restante do genoma (4 a 10) das passagens do vírus FGA/89 em cérebro de camundongos....	47
Figura 4.4 -	Representação diagramática da estrutura do domínio helicase da proteína NS3 do vírus DEN-2.....	51
Figura 4.5 -	Fenômeno de quasiespécie observado durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89.....	52
Figura 4.6 -	Imunofluorescência indireta de células infectadas com os vírus FGA/89 e FGA/NA P6 4 dpi.....	54
Figura 4.7 -	Taxa de mortalidade de camundongos neonatos durante o processo de neuroadaptação do vírus BR-01/MR.....	55
Figura 4.8 -	Sobrevivência de camundongos após inoculação i.c. com o isolado BR/01-MR durante o processo de neuroadaptação...	56
Figura 4.9 -	Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amplificação por <i>Nested</i> -PCR para diagnóstico de dengue da cinética de infecção em cérebro de camundongos da variante viral MR/NA P6.....	57
Figura 4.10 -	Amplificação por qRT/PCR das variantes neuroadaptadas FGA/NA P6 e MR/NA P6.....	58
Figura 4.11 -	Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amplificação por <i>Nested</i> -PCR para identificação de flavivírus.....	59

Figura 4.12 -	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação por <i>Nested-PCR</i> para HSV e VZV.....	59
Figura 4.13 -	Imunofluorescência indireta de células infectadas com MR/NA P1 e MR/NA P2 10 dpi.....	60
Figura 4.14 -	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação independente dos genes que codificam para as proteínas E (1) e NS3 (2 e 3) e região 5' UTR e 3' UTR do vírus MR/NA P1 proveniente do sobrenadante de cultura em células AP-61.....	61
Figura 4.15 -	Amplificação por PCR e qRT/PCR da variante neuroadaptada MR/NA P7.....	63
Figura 4.16 -	Histopatologia do SNC de camundongos infectados com mock e com os vírus FGA/89, FGA/NA P6, BR/01-MR e MR/NA P7, corados com hematoxilina e eosina.....	66
Figura 4.17 -	Micrografia eletrônica das secções do SNC de camundongos infectados com mock, FGA/NA P6 e MR/NA P7 embebidos em resina PolyBed-812.....	69
Figura 4.18 -	Detecção das proteínas E e NS1 de flavivírus por imunocitoquímica em secções ultrafinas do SNC de camundongos infectados com a variante FGA/NA P6 embebidos em Lowicril HM20.....	72
Figura 4.19 -	Detecção das proteínas E e NS1 de flavivírus por imunocitoquímica em secções ultrafinas do SNC de camundongos infectados com a variante MR/NA P7 embebidos em Lowicril HM20.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -	Oligonucleotídeos iniciadores específicos para DEN-1 utilizados nas reações de RT/PCR.....	30
Tabela 3.2 -	Oligonucleotídeos iniciadores e sondas específicas para DEN1 utilizados nas reações de qRT/PCR.....	34
Tabela 4.1 -	Quantificação do RNA viral normalizado durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89.....	46
Tabela 4.2 -	Substituições de aminoácido nas proteínas E e NS3 observadas durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89, comparadas com o vírus parental.....	48
Tabela 4.3 -	Mutações identificadas nos genomas virais durante o processo de neuroadaptação	50

LISTA DE ABREVIATURAS

μL: microlitro

μm: micrômetro

ADE: Anticorpos potencializadores da infecção (*Antibody dependent-enhancement*)

AP: Fosfatase alcalina (*Alkaline phosphatase*)

AUR: Região a jusante ao AUG (Upstream AUG region)

BCIP: 5-Bromo-4 Cloro-3 Indolyl Fosfato

BOD: Demanda bioquímica de oxigênio (*Biochemical Oxygen demand*)

BSA: Albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)

BVDV: vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus*)

C: Capsídeo

CD: Célula dendrítica

cDNA: DNA complementar

CF: Fator citotóxico

CG: Complexo de Golgi

CL: Célula de Langerhans

Cm²: Centímetros quadrados

CMC: Carboxi metil celulose

CR: Complexo de replicação

CS: Seqüência de ciclização

CSF: Flúido cérebro espinhal (*cerebrospinal fluid*)

DC-SING : C-type Lectin ICAM3-Grabbing Non-Integrin

DENV-1: Vírus da dengue sorotipo 1

DENV-2: Vírus da dengue sorotipo 2

DENV-3: Vírus da dengue sorotipo 3

DENV-4: Vírus da dengue sorotipo 4

DEPC: Dietilpirocarbonato

DL₅₀: 50% da dose letal

DNA: Ácido desoxiribonucléico (*deoxiribonucleic acid*)

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

dpi: Dias pós-infecção

E: Envelope

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético

FD: Febre da dengue

FFU: Unidade formadora de foco (*foci formin unit*)

FHD: Febre hemorrágica da dengue

FIA: Imunodeteção por foco (*focus immunoassay*)

Fig.: Figura

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)

HCV: Vírus da hepatite C (*Hepatitis C virus*)

HSV: Vírus herpes simples (*Herpes simplex viruses*)

ICTV: Comitê internacional de taxonomia de vírus

IFI: Imunofluorescência indireta

IFN: Interferon

IFN-β: IFN-beta

IFN-γ: IFN-gamma

ISRE: Elementos de resposta a estimulação por interferon (*interferon-stimulated response element*)

JEV: Vírus da encefalite japonesa

M: Molar

Mab: Anticorpo monoclonal (*monoclonal antibody*)

MEM: Meio essencial mínimo

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

mg: Miligrama

min.: Minutos

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mM: Milimolar

MOI: Multiplicidade de infecção

mRNA: RNA mensageiro

MurGAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Mus musculus* (*Mus musculus housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

NBT: Nitro-blue-tetrazolium

nm: Nanômetros

NS1-5: Proteínas não-estruturais 1-5

°C: Graus Celsius

OMS: Organização Mundial de Saúde
pb: Pares de bases
PBS: Tampão salina fosfato (*Phosphate buffered saline*)
PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)
PEG: Polietileno glicol
PM: Peso molecular
pmol: Pico mol
prM: Precursora da proteína M
RE: Retículo endoplasmático
rpm: Rotações por minuto
RpRd: RNA polimerase dependente de RNA
RT: Transcrição reversa (*reverse transcription*)
SCD: Síndrome do choque da dengue
Seg.: Segundos
SFB: Soro fetal bovino
SL: *Stem-loop*
SLA: Largo *stem-loop*.
SNC: Sistema nervoso central
TBE: Vírus transmitido por carrapatos (*Tick borne encephalitis virus*)
TBE: Tris-borato-EDTA
TBS: *Tris buffered saline*
Tw: Tween
U/ μ L: Unidades por microlitro
UTR: Região não-traduzida (*Untranslated region*)
V: Volume
VZV: Vírus da varicella zoster (*Varicella zoster virus*)
WHO: *World Health Organization*
WNV: Vírus do Oeste do Nilo (*West Nile virus*)
YFV: Vírus da febre amarela (*yellow fever virus*)

RESUMO

O vírus da dengue (DENV), um membro do gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), é um arbovírus que causa severa doença em humanos. O espectro da doença varia desde uma febre indiferenciada (FD) até a febre hemorrágica da dengue (FHD), que pode evoluir para a síndrome do choque da dengue (SCD) e morte. Mais recentemente, o perfil clínico da infecção pelo DENV está mudando e um aumento significativo de casos clínicos com manifestações neurológicas vem sendo documentado. O(s) mecanismo(s) pelo qual o DENV pode causar doença grave e a contribuição de fatores virais e do hospedeiro para o desenvolvimento dos quadros clínicos severos, não está completamente compreendido. A falta de um modelo animal, que reflita as formas graves da doença é um obstáculo para se estudar alguns aspectos da patogênese da dengue. O sistema nervoso central (SNC) de camundongos neonatos tem sido utilizado como modelo para compreender a fisiopatologia da doença. Para confirmar e definir o envolvimento de substituições de aminoácidos no genoma viral que pudessem estar relacionadas com a aquisição de um fenótipo de neurovirulência do DENV em camundongos, a cepas do sorotipo 1 do vírus (DENV-1) FGA/89 foi adaptada ao SNC de camundongos neonatos suíços. A capacidade da nova variante neuroadaptada replicar-se no SNC e provocar encefalite foi analisada. Durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89, uma substituição de aminoácido na proteína de envelope (E) e duas na proteína não-estrutural 3 (NS3) foram observadas. Estas mutações foram identificadas primeiramente nos vírus resultantes da terceira passagem (FGA/NA P3) e observadas até a sexta passagem. As substituições E Phe₄₀₂/Leu e NS3 Leu₄₈₀/Ser identificadas na variante FGA/NA P3-P6, embora não idênticas àquelas observadas em FGA/NA d1d (outra variante neuroadaptada a partir da mesma cepa parental, FGA/89), mapeiam nos mesmos domínios, sugerindo um papel potencial dessas proteínas na aquisição do fenótipo de neurovirulência do DENV-1 em camundongos. Com o intuito de confirmar o envolvimento dessas mutações, um isolado clínico recente (BR/01-MR) foi submetido ao mesmo processo de neuroadaptação. Embora a variante MR/NA P7 tenha se mostrado mais neurovirulenta do que a variante FGA/NA P6, ocasionando danos severos no SNC de camundongos, caracterizados por leptomeningite e necrose de substância branca, não foi possível identificar a presença de partículas infecciosas nem do RNA viral em cada uma das passagens do vírus. No entanto, através de ensaios microscopia eletrônica e imunocitoquímica de secções do SNC de camundongos foi possível observar tanto a presença de partículas virais como das proteínas E e NS1, sugerindo que os danos no SNC dos camundongos infectados foi uma consequência direta da infecção pelo vírus. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram demonstrar a implicação das proteínas E e NS3 no processo de neurovirulência do vírus FGA/NA 89 e que as variantes neuroadaptadas apresentam a capacidade de infectar as células do SNC de camundongos neonatos e ocasionar danos extensivos nos tecidos como leptomeningite e encefalite. Um maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na patogênese da dengue poderá contribuir para o delineamento de estratégias antivirais direcionadas e eventualmente o controle da infecção.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV), a member of the *Flavivirus* genus (family *Flaviviridae*), is an arthropod-borne virus that cause severe disease in humans. The spectrum of illness ranges from a self-limiting fever (DF) to dengue hemorrhagic fever (DHF), which can progress to dengue shock syndrome and death. More recently, the clinical presentation of DENV infection is changing and a significant increase of cases with neurological manifestations has been documented. The precise mechanism(s) by which DEN viruses cause severe disease is still not understood. It has been inferred that both immunological and viral factors determine the severity of disease. The lack of an animal model that reflects the severe forms of the disease is an obstacle to study some aspects of dengue pathogenesis. The central nervous system (CNS) of newborn mice has been used as a model system to study the pathophysiology of dengue disease. To confirm and to define the involvement of the amino acid substitutions in the viral genome that could be related to the acquisition of DENV neurovirulent phenotype for mice, we adapted a strains of dengue virus type 1, FGA/89, in CNS of newborn Swiss mice. The capacity of the neuroadapted variants to replicate in CNS and to cause encephalitis was analyzed. One amino acid mutation in the envelope E protein and two amino acid mutations in the nonstructural NS3 protein were observed during the neuroadaptation process of FGA/89. These mutations were first identified in FGA/NA P3 and fixed until the sixth passage. The substitutions E Phe₄₀₂/Leu and NS3 Leu₄₈₀/Ser identified in FGA/NA P3-P6, although not identical to those observed in FGA/NA d1d (another neuroadapted variant from the same parental strain, FGA/89), mapped to the same domain, suggesting a potential role of these proteins in the acquisition of DENV mice neurovirulent phenotype. Aiming to confirm the involvement of these mutations in dengue neurovirulence, a recent clinical isolate (BR/01-MR) was submitted to the same protocol of neuroadaptation. The neurovirulent variant MR/NA P7 was more neurovirulent for newborn Swiss mice, compared to FGA/NA P6 variant, causing severe damage in CNS of mice, characterized by leptomeningitis and necrosis of white matter. Despite of all these findings, it was not possible to identify neither the presence of viral infectious particle nor the presence of the viral RNA in all the passages of the virus in mice brains. However, by electron microscopy and immune electron microscopy assays it was possible to observe the presence of viral particles and viral proteins E and NS1 in the sections of the CNS of mice, suggesting that the damage observed in the CNS was a direct result of virus infection. Results obtained in this work demonstrate the implication of the proteins E and NS3 in the process of neuroadaptation of the virus FGA/89 and that the neurovirulent variants have the ability to infect CNS of newborn mice causing extensive tissue damage as leptomeningitis and encephalitis. A better knowledge about molecular markers and mechanisms that could be involved in the dengue pathogenesis would be useful for developing new targets to antiviral strategies and eventually control of infection.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A dengue

A dengue é atualmente uma das mais importantes arboviroses (doença transmitida por artrópodes) em termos de distribuição geográfica e incidência de infecção em humanos, que afeta principalmente as regiões tropicais e subtropicais do globo.

Os primeiros relatos da doença dengue na literatura médica foram descritos por David Bylon e August Hirsch em 1779, no Cairo e Jakarta (CAREY, 1971) e por Benjamin Rush em 1789, durante uma epidemia na Filadélfia, Pensilvânia (RUSH, 1789). Rush caracterizou a doença como febril e a denominou de *break-bone fever*. No entanto, não há um consenso sobre quando a dengue apareceu pela primeira vez na população humana. Sugere-se que o mais antigo registro de uma doença semelhante à dengue esteja descrito na enciclopédia médica chinesa datado de 992 d.C. Naquela época, os chineses acreditavam que essa doença estava de alguma forma associada à insetos (GUBLER, 2006). Mas, a etiologia viral da dengue foi evidenciada somente em 1907 por Ashburn e Craig e o papel do mosquito *Aedes aegypti* na transmissão do vírus da dengue ao hospedeiro humano foi estabelecido em 1926 por Siler, Hall e Hitchens.

Desde o reconhecimento da forma clínica da dengue, no século dezoito (RUSH, 1789), a incidência global e a virulência do vírus da dengue (DENV) têm crescido dramaticamente. A distribuição global de epidemias de dengue foi evidente no século XIX, disseminando-se do leste da África para Ásia, para o oeste da Índia e então para as Américas. No século passado os vírus da dengue causaram inúmeras epidemias. Uma série de distúrbios ecológicos e sociais no mundo evidenciados durante a IIª Guerra Mundial contribuiu para a dispersão do mosquito vetor, co-circulação em grande amplitude de novos sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, 2, 3 e 4) e disseminação global da doença. Nessa mesma época, no Sudeste da Ásia, novas formas de manifestação da doença foram atribuídas ao vírus da dengue. Essas novas síndromes denominadas de febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD) transformariam a dengue em uma doença

potencialmente mortal.

Na segunda metade do século XX a dengue adquiriu proporções pandêmicas e a doença, que havia sido erradicada de vários países do continente americano nas décadas de 50 e 60, retorna na década de 70 por falhas na vigilância epidemiológica e pelas mudanças sociais e ambientais ocasionadas pela urbanização acelerada dessa época (GUZMÁN; KOURI, 2003).

A dengue tornou-se um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo considerada endêmica em mais de 100 países da África, das Américas Central e do Sul, do Mediterrâneo Oriental, do Sudeste da Ásia e do Pacífico Ocidental. O número de casos de dengue, nessas regiões, aumentou consideravelmente durante as últimas duas décadas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 2,5 bilhões de pessoas, aproximadamente 40% da população mundial, estejam vivendo em áreas de risco e estima mais de 80 milhões de casos de infecção por ano no mundo (WHO, 2007).

No Brasil, a dengue foi re-introduzida no ano de 1986, após um período de erradicação de mais de 50 anos, no estado do Rio de Janeiro e se disseminou para outros seis estados brasileiros, ocasionando uma grande epidemia causada predominantemente pelo vírus da dengue sorotipo 1 (DENV-1) (SCHATZMAYR et al., 1986). Em 1990, evidenciou-se uma nova epidemia nos estados do Rio de Janeiro, Tocantins e Alagoas. Durante essa epidemia, identificou-se o primeiro caso de infecção pelo vírus da dengue tipo 2 (DENV-2) no Brasil (NOGUEIRA et al., 1990). No ano de 2001, o vírus da dengue tipo 3 (DENV-3) foi introduzido no Brasil, também no estado do Rio de Janeiro e rapidamente dispersou-se para outros estados brasileiros (NOGUEIRA et al., 2001). Segundo dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), no ano de 2002, durante a maior epidemia de dengue no Brasil, com 794.219 casos notificados, os três sorotipos do vírus da dengue co-circularam na maioria dos estados brasileiros (FUNASA, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). Atualmente, a dengue encontra-se disseminada em todas as 27 unidades federativas do Brasil. No entanto, no estado de Santa Catarina ainda não foram registrados casos autóctones da doença.

Nos primeiros sete meses do ano de 2007 foram notificados 438.949 casos de dengue clássica no país e, embora a região Sudeste tenha apresentado o maior número de casos notificados (146.352) neste período, a região Centro Oeste com 103.146 casos notificados apresentou a maior taxa de incidência por 100.000

habitantes. Os estados com maior número de casos confirmados de dengue são Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Ceará. O número de casos de dengue por estado brasileiro e a incidência por área são mostrados na fig. 1.1. As Secretarias Estaduais de Saúde, no período de janeiro a novembro do ano de 2007, notificaram 536.519 casos de dengue clássica (FD), 1.275 casos de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e 136 casos fatais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Embora a dengue constitua um dos principais problemas de saúde pública no mundo, o combate a essa doença depende apenas do controle do mosquito vetor e da disponibilidade de serviços de diagnóstico nas áreas de transmissão, já que não existem drogas antivirais disponíveis e nem uma vacina segura e efetiva contra a infecção pelos vírus da dengue. Desde que o vírus foi isolado a mais de meio século atrás, várias estratégias têm sido exploradas para produzir uma vacina efetiva na prevenção da dengue (HOTTA, 1952; ECKELS et al., 1976, HALSTEAD et al., 1984; FONSECA et al., 1994; WESTAWAY et al., 2003; PUTNAK et al., 2005). No entanto, o desenvolvimento de uma vacina eficaz esbarra em várias limitações como a necessidade de uma vacina tetravalente (para proteger contra os quatro sorotipos), a não existência de um modelo animal capaz de refletir os diferentes graus de gravidade da doença humana e o dogma da infecção potencializada pelos anticorpos heterólogos, além dos relatos recentes da capacidade de recombinação intra-genotípica (HOLMES et al., 1999) e do fenômeno de interferência viral (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977; MALAVIGE et al., 2004; WHITEHEAD et al., 2007). Um melhor entendimento das interações entre vetor, vírus e hospedeiro humano poderia auxiliar no desenvolvimento de medidas mais efetivas para o monitoramento e controle da dengue.

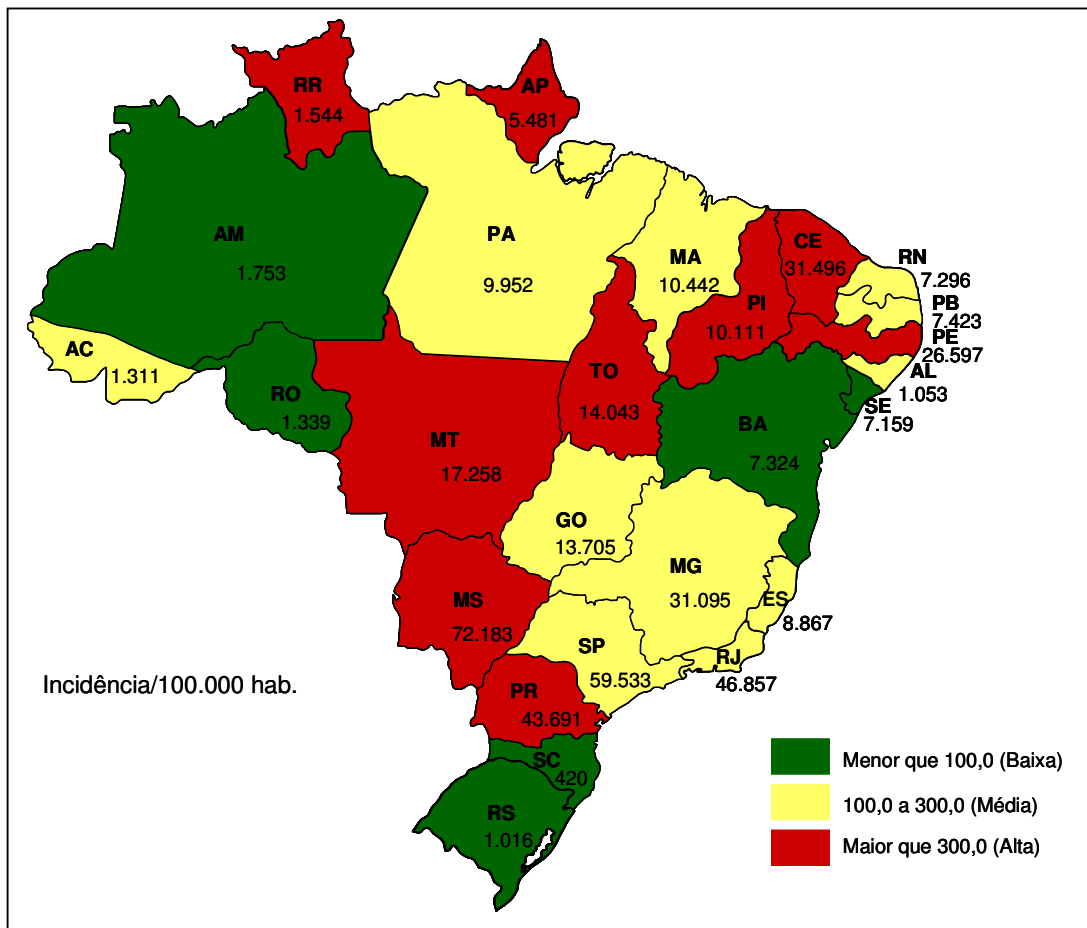


Fig. 1.1 - Distribuição dos casos de dengue por estado e área de incidência, Brasil, 2007. Fonte: Dados do Ministério da Saúde, 2007.

1.2 O mosquito vetor e o ciclo de transmissão

Os primeiros relatos da doença da dengue coincidem com o período de expansão geográfica do mosquito hematófago, *Aedes aegypti*, da África para os trópicos. O *A. aegypti* é o principal vetor envolvido na transmissão do vírus da dengue ao hospedeiro humano. As características antropofílicas, habitat urbano-doméstico e a alta eficiência na transmissão do vírus da dengue, tornam o *A. aegypti* um agente altamente competente para a disseminação da doença em ambientes urbanos e peri-urbanos. As espécies *A. albopictus* e o *A. polynesiensis* também podem sustentar a transmissão do vírus da dengue ao hospedeiro humano (GUBLER, 1998; WEAVER; BARRET, 2004). O mosquito *A. aegypti* é altamente

susceptível às temperaturas extremas e climas secos e encontra-se amplamente disseminado entre os limites de latitude 40°N e 40°S, oferecendo um grande risco de novas epidemias para as populações residentes nessas áreas (Fig.1.2).

Espécies silváticas do mosquito do gênero *Aedes* estão envolvidas com a transmissão enzoótica do vírus da dengue em primatas não-humanos, nas florestas do continente asiático e africano. No entanto, acredita-se que a contribuição desse ciclo enzoótico esteja minimamente relacionada com a transmissão urbana endêmica e epidêmica do vírus da dengue (RICO-HESSÉ, 1990; WANG et al, 2000). Os primatas não-humanos são susceptíveis a infecção pelo vírus da dengue, porém não apresentam as manifestações clínicas da doença observadas em humanos.

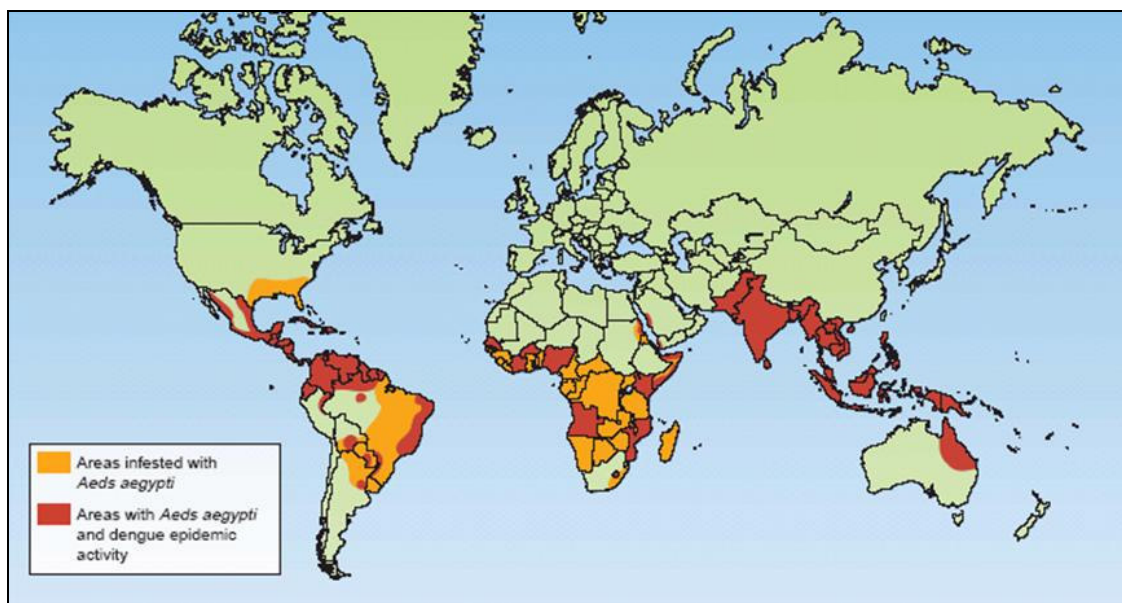


Fig. 1.2 - Distribuição global do mosquito vetor da dengue, *A. aegypti*. As áreas infectadas com o mosquito vetor da dengue (laranja) e as áreas com dengue epidêmica (vermelho) são mostradas. Fonte: MACKENZIE et al., 2004.

Durante o repasto sanguíneo, fêmeas adultas de mosquitos do gênero *Aedes* transmitem o vírus da dengue ao hospedeiro humano. O ciclo de transmissão envolve a ingestão de sangue virêmico (partículas virais circulantes no sangue periférico) pelo mosquito vetor e após um período de incubação dito extrínseco ocorre a transferência do vírus ao hospedeiro vertebrado. O período de incubação no vetor dura de 8 a 12 dias e é requerido para que ocorra a replicação e

disseminação viral na hemocele e em todos os tecidos do inseto, até finalmente infectar as glândulas salivares e poder transmitir o vírus para um novo hospedeiro humano susceptível (Fig. 1.3). O mosquito permanece infectado e assintomático durante toda sua vida e é capaz de transmitir o vírus da dengue para diversas pessoas, devido a sua capacidade de se alimentar em múltiplos indivíduos em sucessão. Outra forma importante de transmissão que ocorre entre os mosquitos do gênero *Aedes* é a transovariana, em que o vírus da dengue é transmitido diretamente para a prole, dispensando o homem no ciclo mantenedor.

O hospedeiro humano torna-se virêmico após um período de incubação de 3 a 14 dias, após a picada por um mosquito infectado, concomitante ao início do período febril (RICE, 1996; GUBLER, 1998).

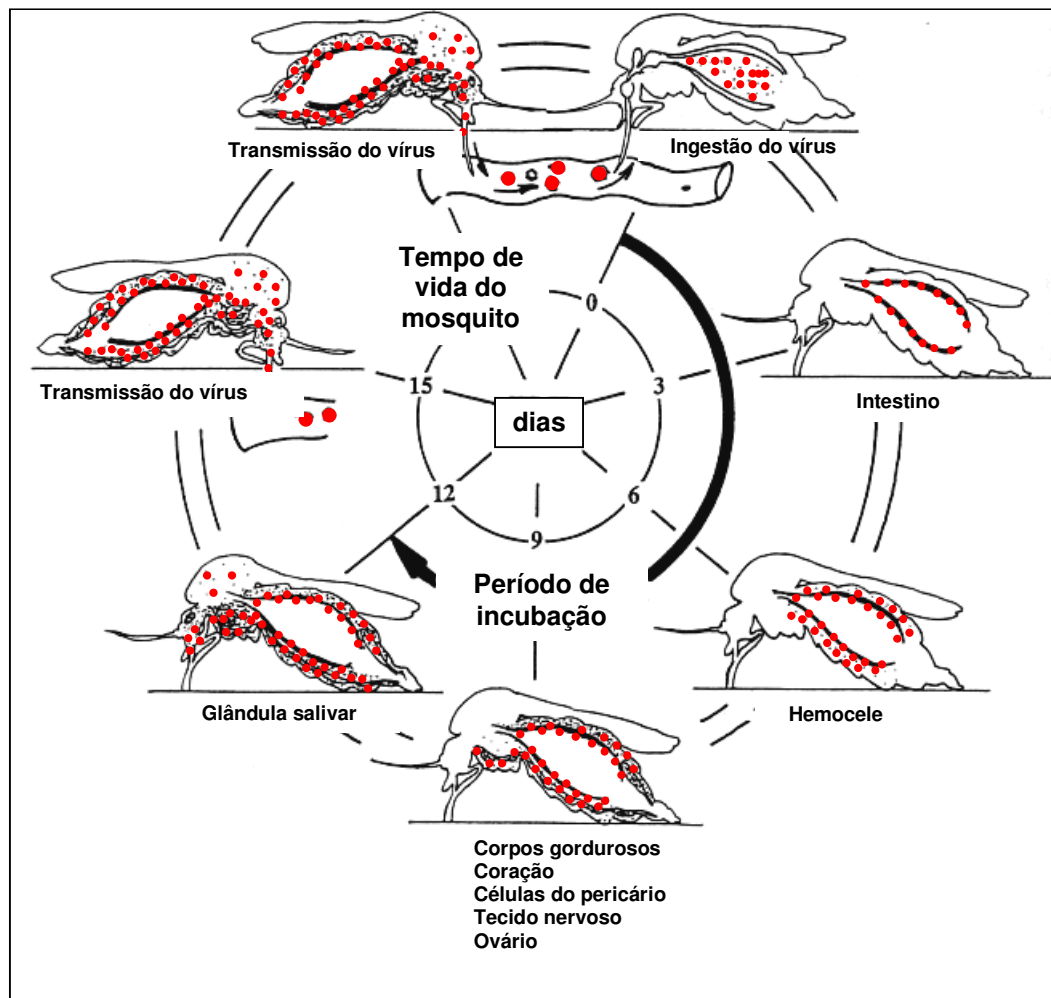


Fig. 1.3 - Ciclo de infecção do vírus da dengue no hospedeiro invertebrado. Fonte: Adaptado de GUBLER, 1998.

1.3 O Vírus

Os vírus da dengue pertencem ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, que compreende mais de 70 vírus distintos. A maioria dos flavivírus é transmitida ao hospedeiro mamífero através da picada de mosquitos ou carrapatos. Diversos membros do gênero *Flavivirus* são de importância médica, tais como os vírus da dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o vírus Transmitido por Carrapato (*Tick Borne Encephalitis Virus*, TBEV) (CALISHER et al., 1989).

O agente etiológico da dengue foi isolado pela primeira vez a partir de soro humano em 1950 através de passagens seriadas em cérebro de camundongos neonatos, na tentativa de se obter uma vacina viva atenuada contra o vírus da dengue. Dessa forma, foi possível identificar e definir os sorotipos DENV-1 (cepa Hawaii) e DENV-2 (cepa New Guinéa) (SABIN; SCHLESINGER, 1945; SABIN, 1952; HOTTA, 1952). O procedimento de inoculação intracerebral em camundongos neonatos é ainda hoje bastante utilizado para isolamento de arbovírus e obtenção de vacinas atenuadas.

No ano de 1957, durante a epidemia de dengue em Manila, Filipinas, novos sorotipos do vírus da dengue, DENV-3 e DENV-4, foram isolados (HAMMOM et al., 1960). De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o vírus da dengue está caracterizado em quatro sorotipos distintos antigenicamente: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, os quais podem apresentar variantes genéticas dentro de um mesmo sorotipo, relacionadas com a virulência e a procedência geográfica da cepa (HEINZ et al. 2000; CALISHER et al., 1989; RICO-HESSE, 1990). Atualmente, no mundo co-circulam todos os sorotipos do vírus da dengue e os quatro subtipos estão associados tanto com febre da dengue (FD) quanto com FHD.

1.3.1 Estrutura viral e organização genômica

O virion é uma partícula esférica de aproximadamente 50 nm de diâmetro envolta por um envelope glicoprotéico, derivado da célula hospedeira. O genoma viral é uma molécula de RNA fita simples com polaridade positiva de aproximadamente 10,8 kilobases. O RNA viral codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3.400 aminoácidos, que é processada co- e pós-traducionalmente por proteases virais e da célula hospedeira. A partir dessa clivagem três proteínas estruturais, C (capsídeo), prM (precursora da proteína de membrana M) e E (envelope), presentes na partícula viral, e sete proteínas não estruturais (NS), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 são originadas (Fig. 1.4). O RNA genômico possui uma estrutura de *cap* na região N-terminal ($^7\text{ME G}^5\text{'-ppp}^5\text{'-N}^{\text{Me}}$) e não apresenta cauda poli(A) na região 3' não traduzida (UTR) (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACK; RICE, 2001).

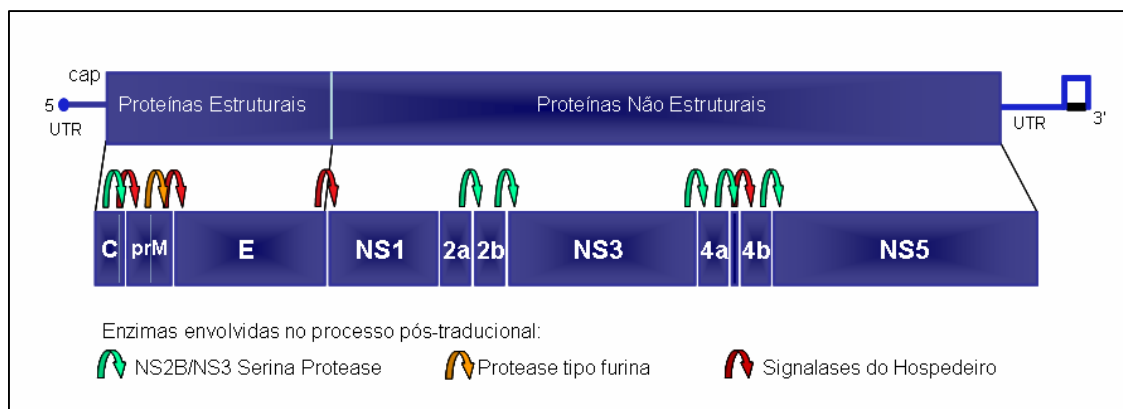


Fig. 1.4 - Organização do genoma do vírus da dengue. O genoma do vírus da dengue apresenta um quadro de leitura aberto capaz de gerar uma poliproteína viral de ~3.400 aminoácidos. A poliproteína viral é clivada por proteases viral e do hospedeiro resultando em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (NS). Fonte: Adaptado de PHILLIPE DESPRÈS.

As regiões 5' e 3' UTR do vírus da dengue parecem desempenhar importante papel na iniciação e modulação da tradução e replicação do genoma viral (ALVAREZ et al., 2006; CHIU; KINNER; DREHER, 2005). Essas regiões são responsáveis pela ciclização do RNA viral, requerida para a atividade eficiente da

RNA polimerase viral dependente de RNA (RpRd), e formam estruturas secundárias em forma de *stem-loop* (SL) que interagem com outras proteínas virais e fatores específicos de tradução e replicação da célula hospedeira. Estudos demonstraram que as seqüências de ciclização (CS) das regiões 5' e 3' UTR, presente em todos os flavivírus transmitidos por mosquitos, bem como as seqüências 5' e 3' UAR (anterior ao códon AUG de iniciação de tradução) são essenciais para a formação do complexo RNA-RNA (ALVAREZ et al., 2005). A ciclização do RNA juntamente com a presença de uma estrutura de *stem loop* (SL) conservada nas regiões 5' e 3' UTR constituem uma importante conformação requerida para a replicação viral (BRINTON et al., 1986; TILGNER, 2005; FILOMATORI et al., 2006). Filomatori et al., (2006) demonstraram que as interações RNA-RNA entre as seqüências 5' e 3' UTR do genoma do vírus da dengue aumentam a síntese de RNA viral apenas na presença da estrutura secundária presente na região 5' UTR do genoma viral, denominada de largo *stem-loop* (SLA). Os autores evidenciaram que a proteína NS5 que é uma RdRp discrimina o RNA viral pelo reconhecimento específico da SLA. Dessa forma, foi proposto um novo mecanismo para a síntese da fita negativa de RNA viral, em que a RdRp liga-se a SLA da região 5' UTR do genoma viral e alcança o local requerido para a iniciação da transcrição, a região 3' UTR, através das interações RNA-RNA. Diversos trabalhos têm demonstrado a importância das regiões 5' e 3' UTR para a replicação e viabilidade viral (CAHOUR et al. 1995; YOU; PADMANABHAN, 1999.; YU; MARKOFF, 2005).

A proteína C, composta por 120 resíduos de aminoácidos, está envolvida no empacotamento do genoma viral. A proteína glicosilada prM de aproximadamente 18,5 kDa, peso esse modificado pela adição de resíduos de carboidratos, é clivada tardiamente por uma protease tipo furina presente na célula hospedeira, gerando a proteína estrutural M de 8 kDa. A proteína M juntamente com a proteína E, formam a estrutura externa da partícula viral. prM possivelmente funciona como uma chaperona, auxiliando a correta montagem e enovelamento da proteína E (MUKHOPADHYAY et al., 2005).

A proteína E, exposta na superfície do virion, apresenta peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Essa glicoproteína é responsável pelas principais propriedades biológicas do vírus, incluindo a interação com receptores de superfície da célula, fusão com a membrana endossomal da célula hospedeira em pH ácido, age como hemaglutinina viral e constitui o principal componente antigênico do virion,

sendo responsável pela neutralização de anticorpos (LINDENBACK; RICE, 2001). Evidências indicam que a proteína E desempenha um papel na patogenicidade de diversos flavivírus não apenas pela definição do tropismo celular como também afetando a penetração do vírus (GOLLINS; PORTERFIELD, 1986; REY, 2003; MUKHOPADHYAY et al., 2005).

Modis et al., (2004) determinaram a estrutura cristalográfica do fragmento solúvel da proteína de envelope do vírus da dengue. A proteína consiste de um dímero, em que cada monômero é composto por três domínios folhas β : um domínio de fusão/dimerização (domínio II), um domínio central (I) e um domínio envolvido na ligação com o receptor da célula hospedeira (domínio III). A partícula viral madura é composta por aproximadamente 180 cópias da proteína de envelope (Fig. 1.5). O arranjo do ectodomínio na partícula viral madura, na forma de três dímeros paralelos, e a presença dos lipídios derivados da célula hospedeira isolam totalmente o nucleocapsídeo viral do meio externo.

A proteína E do vírus da dengue é glicosilada em determinados resíduos de aminoácidos. Os principais sítios de glicosilação encontram-se especialmente próximas ao domínio III da proteína. No entanto, o número e a posição de resíduos glicosilados não são conservados entre os vírus de diferentes cepas, o que sugere que esses carboidratos modificados na superfície do vírus modulam a especificidade do ligante ao receptor alvo (JOHNSON et al., 1994; MUKHOPADHYAY et al., 2005).

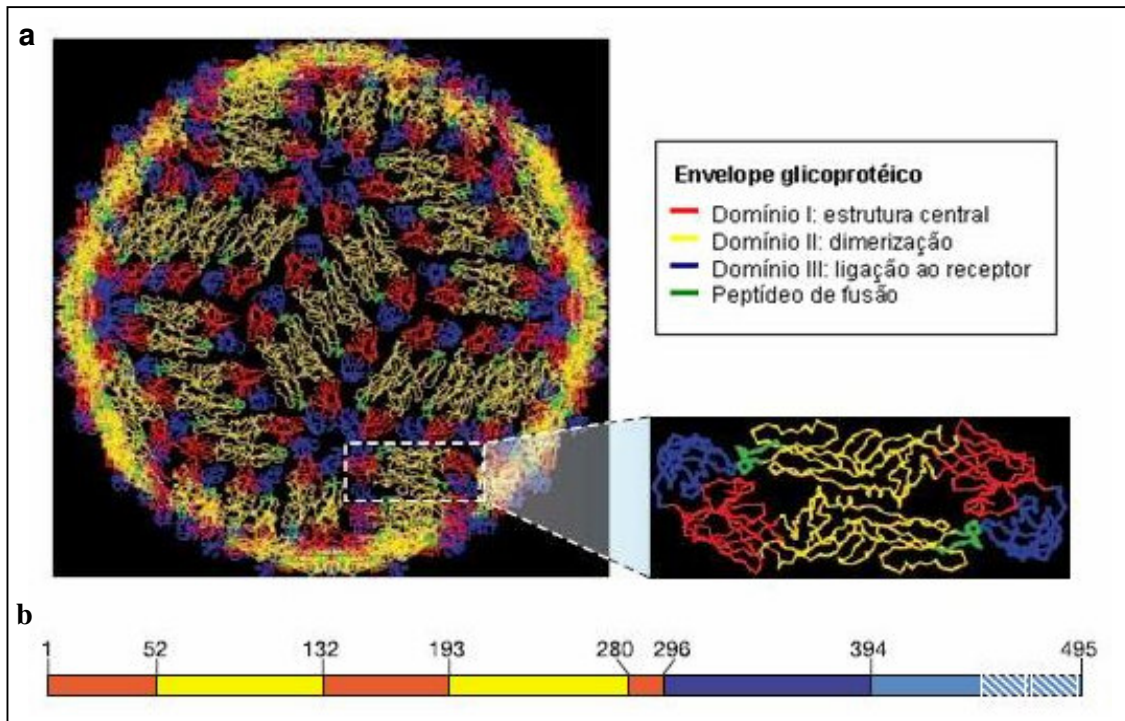


Fig. 1.5 - Estrutura do ectodomínio da proteína de envelope na partícula madura do vírus da dengue. **(a)**. Empacotamento da proteína E na superfície do vírus, o peptídeo de fusão é mostrado na cor verde. **(b)**. Os domínios I, II e III da proteína E estão representados nas cores vermelho, amarelo e azul, respectivamente. As linhas brancas transversais indicam os 53 resíduos de aminoácidos que constituem a âncora hidrofóbica que liga a região C-terminal da proteína E com o ectodomínio da proteína. Fonte: Adaptado de MODIS et al., 2004 e WHITEHEAD et al., 2007.

As proteínas não estruturais são essenciais para a replicação do RNA viral, estando envolvidas no complexo de replicação (CR). A glicoproteína NS1 não constitui a partícula viral infecciosa e pode ser encontrada em células de mamíferos sob três diferentes formas: (a) associada às membranas intracelulares, co-localizando com a forma replicativa do RNA viral dupla fita em células de mamífero e de inseto, sugerindo o papel dessa proteína como co-fator para a replicação viral (MACKENZIE et al., 1996), (b) associada à superfície celular, sugerindo envolvimento na transdução de sinal (JACOBS et al., 2000) (c) em solução sob a forma hexamérica (FLAMAND et al., 1999) e acumulada no soro de pacientes infectados com o vírus (LIBRATY et al., 2002). Os níveis de proteína NS1 circulante no soro de pacientes infectados têm sido correlacionados com a gravidade da doença (AVIRUTNAN et al., 2006). Tanto as formas solúveis da proteína NS1 ou associadas à superfície celular podem desempenhar um importante papel na patogênese da dengue (LIBRATY et al., 2002; ALCON-LEPODER et al., 2005).

Avirutnan et al., (2007) sugerem que habilidade da proteína NS1 solúvel em se ligar às células endoteliais, em diferentes tecidos, e o subsequente reconhecimento por anticorpos anti-NS1 poderiam contribuir para o extravasamento vascular que ocorre em casos de infecção severa pelo vírus da dengue durante a infecção secundária.

A proteína NS2B de 14 kDa age como co-fator da NS3 protease, sendo essa interação responsável por todas os eventos de clivagem na maturação da poliproteína viral (CHAMBERS et al., 1990; BERA; KUHN; SMITH, 2007).

A proteína NS3, de aproximadamente 69 kDa, desempenha importante papel no processamento da poliproteína e na replicação do genoma viral. Essa proteína apresenta uma atividade multifuncional. A região amino-terminal (167 resíduos de aminoácidos) apresenta um domínio serina-protease que requer a associação da proteína NS2B para catalisar clivagens de várias proteínas virais (ARIAS et al., 1993) (Fig. 1.4). A região carboxi-terminal da proteína NS3 (171-618) apresenta atividade de RNA triphosphatase (RTPase), que promove a desfosforilação da região 5' UTR para a adição do *cap*, e um domínio que codifica a enzima helicase. As helicases são enzimas envolvidas na abertura da região de dupla hélice de ácidos nucléicos durante a replicação, em uma reação ATP-dependente (LINDENBACH; RICE, 2001; XU et al., 2005). O domínio helicase da proteína NS3 do vírus da dengue está classificado na superfamília II das RNAs helicases, baseado na similaridade e organização de motivos conservados. A superfamília II das helicases apresenta pelo menos sete motivos conservados (I, Ia, II-VI) (TUTEJA; TUTEJA, 2004). Esses motivos estão presentes em uma variedade de famílias de proteínas que se ligam a nucleotídeos e que participam de diversas funções celulares por promover a hidrólise de NTP com movimento direcional, desestabilização da dupla hélice de ácidos nucléicos, processamento de RNA e recombinação e reparo do DNA (SINGLENTON; WIGLEY, 2002). Estudos de mutagênese sítio dirigida demonstram que o vírus da dengue e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) com atividade helicase comprometida não são hábeis a se replicar e que mutações na proteína NS3 podem reduzir ou até mesmo suprimir a sua atividade ATPase ou helicase, demonstrando a importância do domínio helicase na replicação viral (CUI et al., 1998; GRASSMANN, ISKEN; BEHRENS, 1999; MATUSAN et al., 2001; BOOKS et al., 2002).

A proteína NSB4 parece estar envolvida no bloqueio da transdução de sinais pelos receptores de interferon (IFN) durante a infecção pelo vírus da dengue.

Munõz-Jordán et al. (2003; 2005), demonstraram que a proteína NS4B dos flavivírus reduz a fosforilação de STAT1 em resposta ao tratamento com IFN-beta (IFN- β) e IFN-gamma (IFN- γ) e bloqueia os elementos de resposta à estimulação por interferon (ISRE) nas células estimuladas com IFN. Além disso, Umareddy et al. (2006), demonstraram que a proteína NS4B interage com o motivo helicase da proteína NS3 (303-618) e dissocia a proteína do RNA dupla fita, aumentando a sua atividade helicase *in vitro*. Esses resultados sugerem que a proteína NS4B modula a replicação viral via interação com a proteína NS3, provavelmente, auxiliando no deslocamento dessa proteína pelo RNA dupla fita e aumentando a processividade da enzima *in vitro*.

A função das pequenas proteínas associadas à membrana NS2A e NS4A não está completamente elucidada. No entanto, estudos recentes sugerem que a proteína NS4A encontra-se ancorada à membrana do retículo endoplasmático e co-localiza com a proteína NS1 e RNA viral, sugerindo o envolvimento dessa interação no processo de replicação (LINDENBACH; RICE et al., 2001). A proteína NS4A também interage com as proteínas NS3 e NS5 (WESTAWAY et al., 2003).

A enzima NS5 é a maior das dez proteínas dos flavivírus com aproximadamente 104 kDa e apresenta múltiplos domínios, dos quais pelo menos dois contêm enzimas que estão envolvidas no ciclo replicativo do vírus. A região amino-terminal da proteína constitui uma metiltransferase, que está associada com a reação de adição de *cap* ao RNA, enquanto, a região carboxi-terminal apresenta motivos que indicam atividade de RNA polimerase dependente de RNA (BOOKS et al., 2002; CUI et al., 1998; KROMYKH et al., 1999).

1.3.2 O ciclo viral

Os vírus da dengue são introduzidos em células localizadas na pele do hospedeiro humano, por endocitose mediada por clatrina, via interação entre glicoproteínas de superfície viral e receptores específicos de superfície celular. Diversas moléculas, tais como proteínas, heparan sulfato e glicosaminoglicanos de matriz extracelular (PUTNAK; KANESA-THASAN; INNIS, 1997; BIELEFELDT-OHMANN, 1998, GERMI et al., 2002) já foram descritas como possíveis receptores

celulares. No entanto, o papel dessas estruturas no processo de adsorção viral não está completamente identificado (HILGARD; STOCKERT, 2000; CHU; NG, 2004). Estudos recentes demonstram que as células dendríticas (CDs) imaturas e as células de Langerhans (CLs), as quais normalmente residem na epiderme, apresentam moléculas de superfície celular que são reconhecidas pelo vírus da dengue, tal como a molécula *C-type lectin ICAM3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN), e constituem alvos potenciais para a infecção inicial do vírus da dengue no hospedeiro humano (NAVARO-SANCHEZ et al., 2003; LOZACH et al., 2005). Durante o processo de maturação, as CDs, que não são células altamente especializadas na apresentação de antígenos aos linfócitos T, poderiam facilitar a infecção sistêmica em fagócitos mononucleares, principal alvo celular para a replicação do vírus da dengue (MORENS et al., 1991; WU et al., 2000).

Logo após a partícula viral ser internalizada na célula hospedeira, a acidificação da vesícula endossomal promove a dissociação dos dímeros da proteína E e a re-associação irreversível dos monômeros na forma de trímeros. Essa mudança conformacional na proteína expõe o peptídeo de fusão que promove a fusão das membranas virais e do endossoma (Fig. 1.6). Em seguida, o nucleocapsídeo é liberado e desmontado no citoplasma da célula, onde ocorre a tradução e replicação simultânea do RNA viral. (MODIS et al., 2004).

Como ocorre com outros vírus RNA de polaridade positiva, o genoma do vírus da dengue atua como RNA mensageiro (mRNA) (ROIZMAN; PALESE, 1996) e utiliza fatores, ainda desconhecidos, da célula hospedeira para traduzir a poliproteína viral. O RNA viral é replicado via um RNA intermediário de polaridade negativa, o qual serve como molde para a síntese do RNA genômico de polaridade positiva (WESTAWAY, 1987). Durante o processo de tradução, as proteínas virais NS são clivadas, por proteases virais do tipo serina e por sinalases da célula hospedeira, e auxiliam no processo de replicação do RNA viral. A proteína NS5, que é uma RNA polimerase dependente de RNA, associa-se a proteína NS3 (BOOKS et al., 2002) e a outras proteínas virais para formar o complexo de replicação.

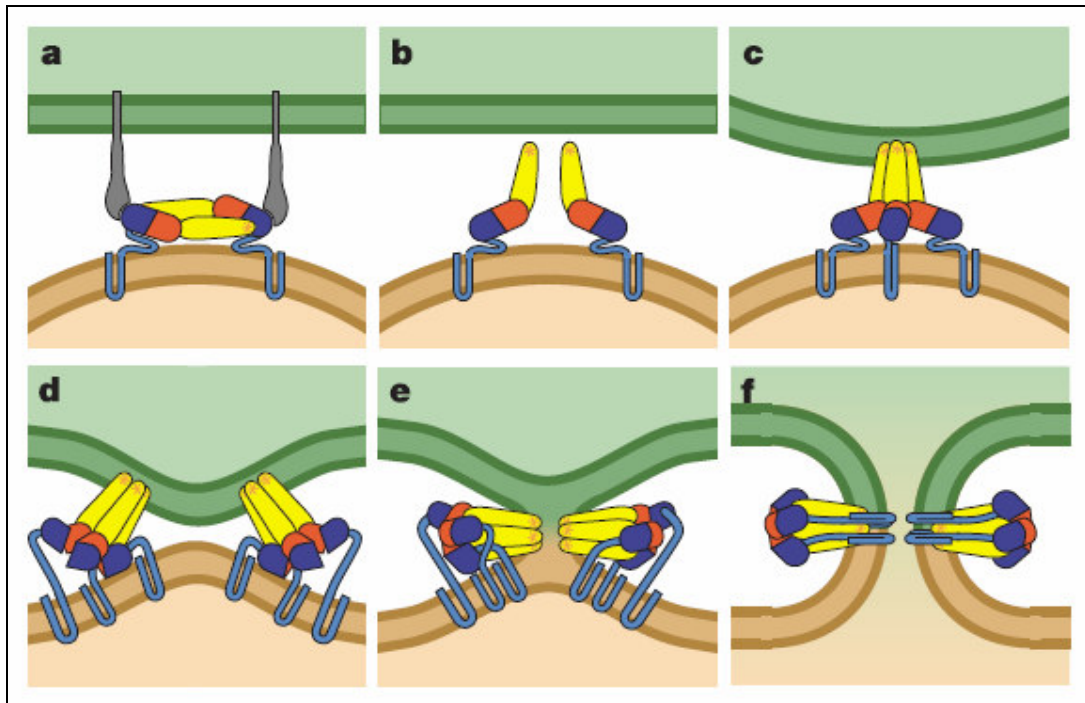


Fig. 1.6 – Mecanismo proposto para a fusão da membrana viral com a membrana endossomal da célula hospedeira. O ectodomínio da proteína E está representado como na figura 1.5, com a âncora trans-membrana representada em azul claro. **a.** A proteína E, provavelmente através do domínio III, liga-se ao receptor na superfície da célula hospedeira e o virion é internalizado por um endosso ma. **b.** A redução do pH no endosso mo ocasiona uma mudança conformacional na proteína E, expondo o peptídeo de fusão presente no domínio II e permitindo o rearranjo do dímero da proteína E em monômeros. **c.** O peptídeo de fusão insere-se na camada de hidrocarbonetos da membrana da célula hospedeira, promovendo a formação de um trímero. **d.** Os trímeros se unem desde o domínio de fusão até a ponta do domínio I, que constitui a base do trímero. O domínio III desloca-se para promover o contato entre os trímeros, dobrando a porção C-terminal da proteína E em direção ao peptídeo de fusão. A energia liberada por esse dobramento curva as membranas opostas. **e.** A criação de um contato adicional entre a região de âncora e o domínio II da proteína E conduz à primeira hemi-fusão e então **(f.)** a formação de poros de fusão lipídicos. Fonte: MODIS et al., 2004.

Durante o processo de tradução, a região N-terminal da poliproteína recém sintetizada, contendo as proteínas estruturais e a proteína NS1, é translocada pela presença de seqüências sinais de transporte e ancorada nas membranas do retículo endoplasmático (RE). Após a clivagem proteolítica por proteases viral do tipo serina e signalases da célula hospedeira, as proteínas NS1, E e prM são liberadas no lúmen do RE, no entanto, a proteína C permanece associada a membrana do RE na porção citoplasmática. No lúmen do RE as proteínas prM e E formam um complexo heterodimérico, importante para promover o correto enovelamento da proteína E. A partícula viral é montada nas membranas do RE, quando novas proteínas e o RNA genômico, recentemente sintetizado, são originados no lúmen do RE. No complexo

de Golgi (CG), ocorre a clivagem dos peptídeos pr e M, a dissociação do heterotrímico e a conversão da partícula viral imatura em partícula viral infecciosa madura. As partículas infecciosas e as partículas subvirais resultantes são liberadas da célula hospedeira por exocitose e estão aptas a infectar uma nova célula hospedeira. (MUKHOPADHYAY et al., 2005).

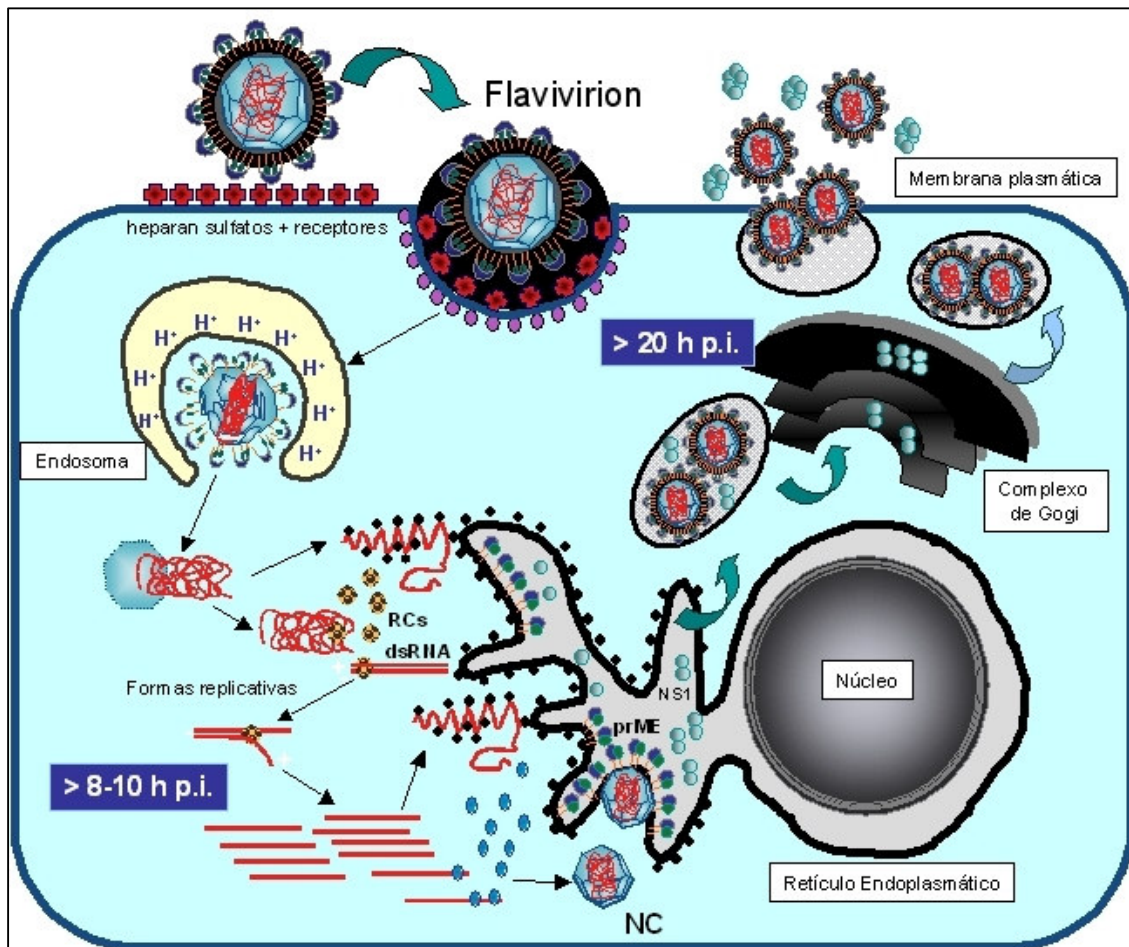


Fig. 1.7 - Ciclo de replicação do vírus da dengue. O vírus entra na célula por endocitose mediada por receptores, resultando na liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira. O RNA viral é replicado via uma fita de RNA negativo intermediária que serve como molde para a produção de RNA genômico. As partículas virais são montadas nas membranas do RE, transportadas através da via secretória da célula hospedeira e liberadas por exocitose. Fonte: Adaptado de PHILIPPE DESPRÈS.

1.4 Patogênese

A infecção pelo vírus da dengue pode ocasionar manifestações clínicas que variam desde febre indiferenciada denominada de febre da dengue ou dengue clássica (FD) até formas mais graves da doença como FHD e SCD.

A FD é uma doença de curta duração que se caracteriza por febre alta (39° a 40°C), cefaléia, artralgia, mialgia, náuseas, vômitos, exantemas, dor retro-orbital, leucopenia. A doença raramente causa morte e os sintomas desaparecem por volta de duas semanas, no entanto, alguns pacientes podem apresentar um período de convalescença prolongado, com grande debilidade física (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A FHD é caracterizada por febre alta que permanece por 2 a 7 dias, permeabilidade vascular, com conseqüente extravasamento de plasma, baixo número de plaquetas e falha circulatória. Os sintomas iniciais da FHD são semelhantes aos da FD, mas o quadro evolui rapidamente e manifestações hemorrágicas tais como epistaxe, gengivorragia, hemorragia em diversos órgãos são observadas e atribuídas ao aumento de permeabilidade vascular. Em casos leves a moderados, os sinais e sintomas desaparecem logo após o desaparecimento da febre. No entanto, em casos severos pode haver comprometimento do sistema circulatório e o paciente pode progredir rapidamente para choque hipovolêmico, denominado de síndrome do choque da dengue (SCD), e pode ser fatal (GUBLER, 1998). A maioria dos casos de FHD/SCD ocorre como resultado de uma infecção secundária com um diferente sorotipo do vírus da dengue. No entanto, estudos demonstram que a liberação de citocinas imuno-mediadas por células dendríticas e monócitos, infectadas pelo vírus da dengue, e endotélio vascular apresentam relevância na patogênese da FHD/SCD (LEONG et al, 2007).

Recentes observações indicam que o perfil clínico da doença tem se modificado e complicações como encefalopatia, hepatomegalia com falha hepática fulminante têm sido descritas com relativa freqüência, nos casos de FHD (RIGAU-PÉREZ et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2002). A mudança na sintomatologia da dengue pode ser causada por inúmeros fatores, incluindo a cepa do vírus infectante e o estado imunológico do hospedeiro. Duas hipóteses principais têm sido estabelecidas para explicar a patogênese das formas graves da doença. A primeira

hipótese relaciona os fatores de virulência de determinadas cepas com o aumento da patogenicidade (ROSEN, 1977, LEITMEYER et al., 1999; MESSER et al., 2002). A segunda hipótese propõe que o desenvolvimento de uma doença mais severa da dengue deve-se a uma infecção secundária com um sorotipo diferente da primeira infecção, que seria responsável pelo efeito de amplificação dependente de anticorpos. O fenômeno de anticorpos potencializadores da infecção (ADE) ocorre quando anticorpos heterotípicos não neutralizantes, provenientes de uma infecção primária por um dos sorotipos do vírus da dengue, opsonizam a partícula viral infectiva durante uma infecção heterotípica subsequente, mas não são capazes de neutralizar o vírus. O complexo anticorpo subneutralizante-vírus resultante liga-se a receptores Fc γ (Fc γ R) de monócitos circulantes, facilitando, dessa forma, a infecção do vírus nesse tipo celular, exacerbando a infecção e conseqüentemente conduzindo para o desenvolvimento de uma doença mais severa. (HALSTEAD et al., 1977). Essas hipóteses não são totalmente exclusivas e acredita-se que ambas estejam envolvidas no desencadeamento de uma doença mais severa.

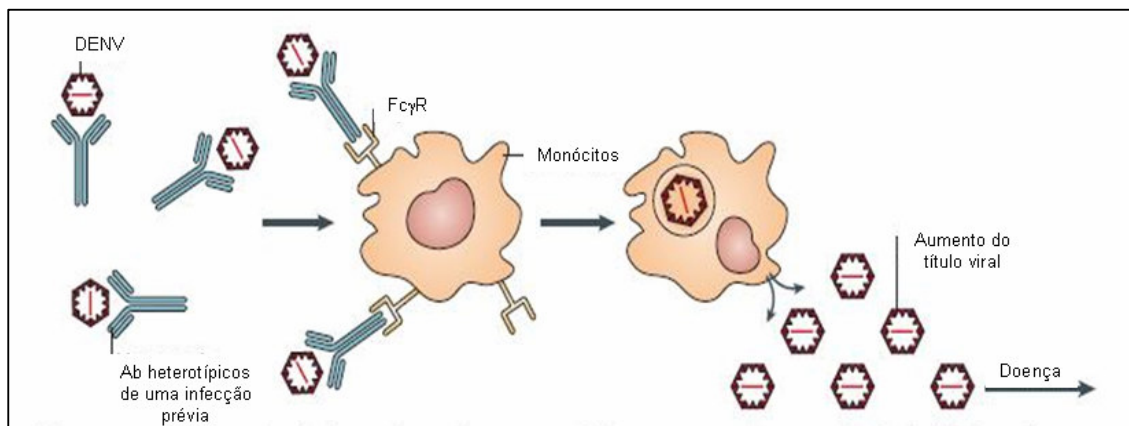


Fig. 1.8 – Modelo para amplificação dependente de anticorpos da replicação do vírus da dengue. Fonte: WHITEHEAD et al., 2007.

O RNA do vírus da dengue tem sido identificado no fluído cérebro espinhal (CSF) de pacientes com doença da dengue de envolvimento neurológico desde 1978 (SUMARMO et al., 1978, DOMINGUES et al., 2007). Estudos recentes detectaram antígeno e RNA viral no tecido cerebral de humanos em casos fatais de infecção pelo vírus da dengue (BHOOPAT et al., 1996; MIAGOSTOVICH et al., 1997; MIAGOSTOVICH et al., 2006). Ramos et al., (1998) demonstraram em um

caso fatal de FHD a presença de DENV-4, por imunohistoquímica, em neurônios, astrócitos, microglia e células endoteliais. Mais recentemente, Miagostovich et al. (2006) detectaram o vírus DENV-3 em secções do cérebro de um caso fatal através da técnica de RT/PCR. Esses dados enfatizam a ocorrência de encefalite viral ocasionada pelo vírus da dengue.

As manifestações neurológicas mais freqüentes observadas em pacientes durante a infecção da dengue são encefalites (SOLOMON et al., 2000), encefalomielite aguda disseminada (YAMAMOTO et al., 2002), encefalite aguda disseminada pós-infecção, poliradiculoneurite aguda (PALMA-DA CUNHA-MATTA et al., 2004), mononeurite (PATEY et al., 1993), e também encefalopatia sem encefalite (CHOTMONGKOL et al., 2004). Sinais clínicos da doença neurológica causada pelo vírus da dengue são associados a reduzidos níveis de consciência, severa dor de cabeça, sinais neurológicos focais e convulsões (SOLOMON et al., 2000). A fisiopatologia de envolvimento neurológico na infecção pelo vírus da dengue pode envolver a ocorrência de edema cerebral, hemorragia cerebral, falência hepática fulminante com encefalopatia portosistêmica, anóxia cerebral, hemorragia microcapilar e liberação de produtos tóxicos (SUMARMO et al., 1983; LUM et al., 1996) ou ainda meningites, encefalites, mononeuropatia e polinoneuropatias (BHOOPAT et al., 1996; MIAGOSTOVICH et al., 1997; RAMOS et al., 1998).

A patogênese das formas graves da dengue não está totalmente compreendida. Estratégias que visam avaliar a interação entre o vírus da dengue e suas células alvo têm sido utilizadas para o conhecimento sobre a morfogênese e a patogenicidade desses vírus. A falta de um modelo animal que reflita as formas severas da doença da dengue é um obstáculo para o estudo dos aspectos envolvidos na patogênese da dengue. A adaptação de agentes virais humanos a animais de laboratórios tem se mostrado um método usual para o estudo entre as relações vírus e hospedeiro (RICO-HESSE, 2007; SHRESTA et al., 2006). Embora a entidade resultante de tais manipulações seja freqüentemente diferente daquelas que ocorrem naturalmente em humanos, esse tipo de estudo pode servir como modelo para o estudo de alguns mecanismos básicos envolvidos na patogênese viral (COLE; WEISSEMAN, 1969). De acordo com esses conceitos, Desprès et al. (1998) estabeleceram um modelo murino de encefalite de dengue através de passagens seriadas de DENV-1 FGA/89 (um isolado humano de FD) em cérebro de camundongos e em células de linhagem AP61 (*Aedes pseudocutellaris*) para tentar

compreender a neuropatologia da dengue. Após seis passagens seriadas, duas variantes neurovirulentas foram geradas, FGA/NA d1d e FGA/NA a5c, que ocasionam encefalite fatal em apenas 10 dias pós-infecção. Determinantes genéticos possivelmente responsáveis pela neurovirulência em camundongos foram analisados através do seqüenciamento do genoma completo ou parcial das cepas neurovirulentas FGA/NA d1d e FGA/NA a5c, respectivamente. Foram identificadas três substituições de aminoácidos na proteína E e uma substituição no domínio helicase da proteína NS3, que podem estar potencialmente envolvidas no fenótipo de neurovirulência em camundongos. Bordignon et al, (2007), determinaram a seqüência nucleotídica completa da cepa neuroadaptada FGA/NA a5c e mostraram que apenas uma mutação Met₁₉₆/Val na proteína E e a mutação Leu₄₃₅/Ser na proteína NS3 são idênticas entre as duas cepas neuroadaptadas. Dessa forma, a identificação de marcadores moleculares poderia contribuir para o entendimento da patogênese da infecção pelo vírus da dengue, bem como, fornecer subsídios que possam explicar o envolvimento do sistema nervoso central em casos graves da doença.

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

A dengue tornou-se um problema de saúde pública de expansão mundial, sendo causa de mais de 500 mil hospitalizações e 20 mil mortes por ano. Dados epidemiológicos recentes mostram que aproximadamente 250 mil casos de FHD e SCD ocorrem anualmente e epidemias com alta frequência de casos severos e atípicos de dengue continuam a expandir geograficamente. As principais características clínicas da forma severa da dengue incluem hemorragia, comprometimento do fígado e encefalopatia. Observações recentes demonstram que manifestações neurológicas têm se tornado cada vez mais frequentes em paciente com FD ou FHD. No entanto, apesar da alta morbidade e mortalidade associadas à infecção pelo vírus da dengue, pouco se conhece sobre a patogenia da dengue e até o presente momento não há uma vacina licenciada eficaz ou terapias antivirais específicas contra o vírus.

O sistema nervoso central (SNC) de camundongos neonatos tem sido utilizado como uma alternativa para o estudo da fisiopatologia e caracterização de determinantes genéticos e fatores virais envolvidos na doença causada pelo vírus da dengue.

A fim de melhor compreender a neuropatologia da dengue, mapear e confirmar o envolvimento de possíveis marcadores moleculares de neurovirulência potencialmente envolvidos na aquisição de um fenótipo viral neurovirulento em camundongos, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Adaptar as cepas de DEN-1 FGA/89 e BR/MR-01 através de sucessivas passagens em cérebros de camundongos neonatos, a fim de obter variantes neuroadaptadas.
- Determinar a seqüência nucleotídica completa ou parcial de todas as cepas virais estudadas e comparar as seqüências genômicas das variantes neuroadaptadas com as cepas parentais.
- Identificar a presença de mutações pontuais ou conjunto de mutações nos domínios das proteínas virais, eventualmente implicadas na patogenidade dos vírus.
- Comparar a aquisição do fenótipo de neurovirulência entre as variantes neuroadaptadas e as cepas parentais.

- Analisar a habilidade das variantes neuroadaptadas causarem danos no sistema nervoso central (SNC) de camundongos, através de análises histopatológicas e ultra-estruturais.
- Identificar a presença de antígeno viral no SNC de camundongos infectados com as variantes neuroadaptadas, através da técnica de imunocitoquímica ultra-estrutural.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Soluções e tampões

- **Acetato de amônio:** 750 mM
- **PBS/gelatina:** PBS, 0,2% gelatina
- **PBS/glicerol:** 1x PBS, 10% glicerol
- **PBS:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ x7H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄
- **Solução 2.5 mM dNTPs:** mistura de 2.5 mM de cada desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
- **Solução Carboxi Metil Celulose (CMC):** 32% de CMC em água MQ
- **Solução de clorofórmio/álcool isoamílico:** Clorofórmio (24V), álcool isoamílico (1V)
- **Solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico:** Fenol saturado com 100 mM Tris base pH 7.0 (25V), clorofórmio (24V), álcool isoamílico (1V)
- **Solução de sacarose 30%:** 30% de sacarose em TNE
- **Solução de sacarose 60%:** 60% de sacarose em TNE
- **Solução Triton:** 0,5% de Triton X100 em PBS
- **STE :** 10 mM Tris HCl (pH 7.5), 10 mM NaCl 5M, 1 mM EDTA 0,5 M (pH 8.0)
- **Tampão da Fosfatase Alcalina (AP-Buffer):** 100 mM Tris-HCl pH 9,5 1 M, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂
- **Tampão de amostra para DNA 10x:** 25% Ficoll (tipo 400), 0,25% azul de bromofenol, 25% xileno cianol
- **TBE:** 89 mM Tris-base, 89 mM Ácido bórico, 2 mM EDTA (pH 8.0)
- **TBS:** 100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl (pH 8.0)
- **TBS-Tris:** 1 M Tris HCl (pH 8.0), 5 M NaCl
- **TNE:** 50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA

3.2 Meios de cultura

- **Iscove's medium completo para cultivo de células Vero:** Meio Iscove's (GIBCO®) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 25 µg/mL gentamicina.
- **Leibovitz's L-15 medium completo para cultivo de células C6/36:** Meio L-15 comercial (GIBCO®) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2% de triptose e 25 µg/mL gentamicina.
- **Leibovitz's L-15 medium completo para cultivo de células AP-61:** Meio L-15 comercial (GIBCO®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0,55% de triptose e 25 µg/mL gentamicina.
- **MEM medium completo para cultivo de células Neuro2a:** Meio MEM comercial (GIBCO®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1x solução de aminoácido essencial (GIBCO®), 25 µg/mL e gentamicina.

3.3 Linhagens celulares

- **AP-61:** células de larvas de *Aedes pseudoscutellaris*
- **C6/36:** células da glândula salivar de *Aedes albopictus* clone C6/36 (ATCC)
- **Neuro2a:** Células de neuroblastoma murino (ATCC)
- **Vero:** células de rim de macaco verde africano (ATCC)

3.4 Animais de experimentação

- **Camundongos:** Camundongos (*Mus musculus*) suíços

3.5 Cepas virais

- **DENV-1 FGA/89** (Genbank número de acesso **AF226687**)
- **DENV-1 BR/01-MR** (Genbank número de acesso **AF513110**)
- **DENV-1 FGA/NA-P6** (Genbank número de acesso **EF122231**)

3.6 Histórico de passagens das cepas virais

Duas cepas de DENV-1 distintas (FGA/89 e BR/01-MR), caracterizadas molecular e biologicamente, foram selecionadas para o processo de neuroadaptação. A cepa FGA/89 foi isolada do soro de um paciente com DF, durante a epidemia de 1989 na Guiana Francesa (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993). A cepa BR/01-MR, um isolado clínico recente do Paraná, foi obtida a partir do soro de um paciente com DF e caracterizada em nosso laboratório (DUARTE DOS SANTOS et al., 2002). O vírus FGA/89 foi amplificado em células da linhagem AP-61 (*Aedes pseudocutelar*) e purificado pelo ensaio em placa (DESPRÈS, FRENKIEL; DEUBEL, 1993). O vírus BR/01-MR foi amplificado por baixas passagens (5 passagens) em células da linhagem C6/36 (*aedes albopictus*). Todos os estoques virais, utilizados neste estudo, foram gerados em células de mosquito C6/36 e purificados em gradiente de sacarose, conforme descrito por Gould et al., (1985). O título viral foi determinado pela técnica de titulação viral por imunodeteção de foco (FIA) em células C6/36, de acordo com Desprès, Frenkiel e Deubel, (1993).

As cepas virais selecionadas para este trabalho diferem quanto as suas seqüências nucleotídicas e aminoacídicas e quanto à presença de efeito citopático em células de inseto.

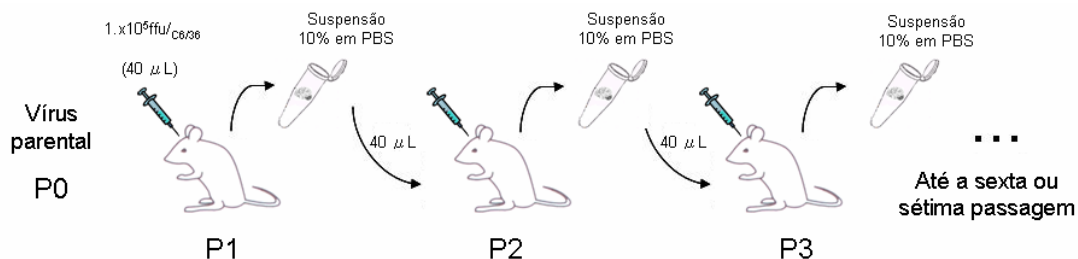
Toda a manipulação dos vírus foi realizada em cabine de segurança biológica classe II.

3.7 Neuroadaptação de vírus dengue em modelo murino

Para o processo de neuroadaptação, seis grupos (passagens 1 a 6) de no mínimo 9 camundongos suíços neonatos (até 48h após o nascimento) foram infectados via intracerebral (i.c.) (GOULD; CLEGG, 1985) com os vírus FGA/89 ou BR/01-MR. A dose viral inicial, expressa em unidades formadoras de foco (FFU), foi estabelecida anteriormente por Desprès et al. (1998) e consistiu de 10^{-2} FFU de 50% da dose letal (DL_{50}) i.c. de FGA/89 (DL_{50} i.c. = 10^7 FFU). Para a neuroadaptação de BR/01-MR estabeleceu-se a mesma dose inicial de 1.0×10^5 FFU/camundongo. Os vírus purificados foram separadamente diluídos em meio de cultura celular L-15 sem SFB para uma concentração de 1.0×10^5 FFU_{C6/36}/ 40 μ L e utilizados para infectar o primeiro grupo de camundongos (P1). Os grupos P2 a P7 foram infectados com uma suspensão dos cérebros infectados do grupo precedente. Portanto, a suspensão de P1 era utilizada para infectar diretamente P2 e P2 para infectar diretamente P3 e assim sucessivamente (ver esquema 1). Oito dias após a infecção (dpi), três animais de cada grupo foram sacrificados por anóxia, utilizando CO₂, para a coleta do tecido cerebral. O restante dos animais era observado por mais 13 dias para análise do aparecimento dos sinais de encefalite e morte. Os tecidos cerebrais dos animais sacrificados (pool de três animais) foram homogeneizados, pesados e utilizados tanto para a obtenção de uma suspensão 10% quanto para a extração do RNA viral. A suspensão 10% sob o peso do homogeneizado do tecido cerebral de três camundongos infectados foi preparada em PBS contendo 50 μ g/mL gentamicina, filtrada a 0,22 μ m e utilizada para infectar i.c. (40 μ L/animal) outro grupo de animais e gerar a passagem subsequente. Os mesmos procedimentos foram repetidos sucessivamente até a passagem 6 (P6) ou 7 (P7). A suspensão 10% resultante de cada uma das passagens dos vírus em cérebro de camundongos foi utilizada para titulação viral por FIA em cultura de células C6/36. Os procedimentos foram igualmente realizados até a P4 em camundongos inoculados com o controle negativo (mock), purificado em gradiente de sacarose, para serem utilizados como controle da inoculação i.c. e assegurar a infectividade e letalidade dos vírus.

Os experimentos com animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Paraná (CEP/UFPR 23075.002948/2007-14).

Esquema 1: Neuroadaptação de vírus dengue em modelo murino



3.8 Titulação viral por imunodeteccção de foco (FIA)

A produção de partículas virais no tecido cerebral de camundongos infectados durante o processo de neuroadaptação foi avaliada através da técnica de titulação viral por FIA. Para tanto, células C6/36 foram semeadas em placas de 24 poços para conter 1.0×10^5 células/poço e infectadas com diluições seriadas (1:10 em meio L-15 sem SFB) da suspensão 10% do tecido cerebral de camundongos de cada uma das passagens. O inóculo (400 µL/poço) foi incubado, em duplicata, com as células por 1h em estufa BOD a 27 °C e, em seguida, substituído por uma mistura de meio de cultura L-15 completo suplementado com 10% de SFB e Carboxi Metil Celulose (CMC) 32%. As culturas de células foram incubadas em estufa a 27 °C por 10 dias. Para a revelação dos focos de infecção, as células foram lavadas com PBS para completa remoção do CMC, fixadas em paraformaldeído 3% por 20 min. a temperatura ambiente, permeabilizadas com triton 0,5% por 4 min. a temperatura ambiente, lavadas com PBS e incubadas com anticorpo policlonal mono específico para DENV-1, Hawaii, (1:100 em PBS) por 1h em estufa a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma®) em estufa a 37 °C por 30 min. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e reveladas após a adição do substrato insolúvel para fosfatase alcalina (BCIP e NBT, Promega®) diluídos em tampão AP.

3.9 Caracterização genômica dos vírus neuroadaptados

Para determinar a dinâmica de aquisição do fenótipo neurovirulento dos vírus FGA/89 e BR/01MR e determinar as mutações de aminoácidos envolvidas neste processo de neuroadaptação, o RNA viral correspondente aos genes que codificam as proteínas E e NS3 das passagens 1, 3 e 5 e o genoma completo das passagens 2, 4 e 6 foram submetidos à ampliações através de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT/PCR) utilizando-se oligonucleotídeos específicos. Posteriormente, a seqüência nucleotídica correspondente foi determinada.

3.9.1 Preparação do RNA viral

O RNA viral de cada uma das passagens foi extraído a partir de 30 mg de tecido cerebral macerado de um *pool* de três camundongos 8 dpi, utilizando tanto o kit comercial *RNeasy mini Kit* (QIAGEN®) quanto a técnica de extração de ácidos nucléicos por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. O RNA extraído com o kit comercial, de acordo com as instruções do fabricante, foi ressuspense em 60 µL de tampão de eluição e alíquotas de 30 µL foram mantidas a – 70 °C.

Para a extração de RNA pelo método de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, 30 mg de tecido cerebral macerado infectado foi ressuspense em 450 µL de água ultrapura livre de RNase (Dietilpirocarbonato-DEPC) e, em seguida, adicionava-se 10% de SDS e β-mercaptoetanol para a concentração final de 1%. A suspensão era homogeneizada e incubada a 70 °C por 3 minutos. Em seguida, adicionava-se à amostra igual volume (500 µL) da solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), e após homogeneização, centrifugava-se a mistura a 16.000 rpm por 2 min. A fase aquosa da solução era transferida para um novo tubo eppendorf livre de RNase, contendo o mesmo volume inicial (500 µL) de clorofórmio/isoamílico (24:1) e repetia-se o processo. A fase aquosa era novamente coletada em um novo tubo eppendorf livre de RNase e o material era tratado com 10 µL de RQ1 DNase livre de RNase a 37 °C em banho-maria por 30 min. Em seguida, as amostras eram

submetidas as etapas de extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio/Isoamílico (24:1), como descrito anteriormente e o RNA precipitado com 3 M acetato de sódio (1:10 do volume da amostra) e etanol absoluto (2,5V) a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante a noite. No dia seguinte, as amostras eram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante descartado. Ao sedimento resultante, adicionava-se 500 μL de etanol 70 % livre de RNase e centrifugava-se a 14.000 rpm por 5 min. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante era descartado e o sedimento seco a temperatura ambiente, ressuspenso em 60 μL de água ultrapura DEPC e alíquotas de 30 μL eram mantidas a -70°C .

3.9.2 Reação de transcriptase reversa (RT)

O RNA viral extraído do tecido cerebral de camundongos infectados foi convertido a uma cópia complementar de DNA (cDNA), através de amplificação enzimática utilizando-se o kit *Improm II Reverse Transcriptase* (Promega®) e oligonucleotídeos iniciadores complementares ao genoma viral, específicos para DENV-1 (Tabela 3.1). O passo inicial da reação consistiu na incubação de 5 μL de RNA misturado a 1 μL (5 pmol/ μL) do oligonucleotídeo iniciador em um termociclador (Eppendorf, Mastercyclers) a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Em seguida, adicionou-se uma mistura contendo: 4 μL do tampão comercial de reação (5x), 2,4 μL de MgCl_2 , 2,7 μL de uma solução de 2.5 mM dNTPs, 0.5 μL de RNase OUT (40 U/ μL) (Invitrogen®), 1 μL de ImpromII™ (5 U/ μL) (Promega®) e água ultrapura DEPC para volume final de 20 μL . A reação foi incubada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. e, em seguida, a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h.

3.9.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O genoma completo e os genes correspondentes as proteínas E e NS3 de DENV-1 foram amplificados por PCR a partir do cDNA sintetizado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para DENV-1 (Tabela 3.1), utilizando-se o kit *TripleMaster PCR System* (Eppendorf®). A reação de PCR consistiu de: 5 μL de

cDNA, 2,7 µL de uma solução de 2.5 mM de dNTPs, 2 µL de tampão comercial de reação (*10x HighFidelity buffer with Mg²⁺*), 2 µL (5 pmol/µL) de cada oligonucleotídio iniciador, 0,3 µL da enzima Triple Master (5 U/µL) e água ultrapura para volume final de 20 µL. A PCR foi submetida aos seguintes ciclos de temperatura: 1 ciclo de 94 °C por 3 min. seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg.; 52 °C por 30 seg. e 68 °C por 2 min. Alíquotas das amostras de DNA amplificadas (1:10) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os amplicons correspondentes as regiões genômicas determinadas foram purificados utilizando-se o kit *High Pure PCR* (Roche®), seguindo o protocolo do fabricante e ressuspensos em 50 µL de água ultrapura ou foram isolados a partir do gel de agarose 0,8% após separação por eletroforese e purificados com o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen®) de acordo com o protocolo do fabricante e ressuspensos em 50 µL de tampão de eluição.

Tabela 3.1 – Oligonucleotídeos iniciadores específicos para DENV-1 utilizados nas reações de RT/PCR

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQÜÊNCIA	REGIÃO GENÔMICA*
DENV-1 5' SP6 +	5'-CGCTCGAGCATACGATTTAGGTGACACTATAGAG TTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAG- 3'	5'UTR (1-24)
DENV-1 M5'+	5'-ACAAACGTTCCGTGGCACTGGCCCCACAT-3'	C (701-730)
DENV-1 EcoApa -	5'-CCTTGTGTTGGACATCTTGAATCGGTGGTGG-3'	E (1.143-1.167)
DENV-1 PhD20 +	5'-GACTTCGGTTCTATAGG-3'	E (2.193-2.212)
DENV-1 CN12 -	5'-GCATCTCCTACAACCACTG-5'	NS1 (2.679-2.698)
DENV-1 CN2+	5'-GCGTATCAATAATGATTG-3'	NS2A (3.525-3.533)
DENV-1 CN13-	5'-GAAGAACCTCTCTGGATG-3'	NS2A (3.763-3.780)
DENV-1 NS2b+	5'-AGTTGGCCCCCTCAATGAAGGA-3'	NS2A (4.129-4.150)
DENV-1 CN 11-	3'-GTCACCACTCCATTTC-5'	NS3 (4.969-4987)
DENV-1 + 28Mer	5'-CCGCTCGAGATATCTCCAGCCATAGTCCGT GAGGC- 3'	NS3 (5.127-5.155)
DENV-1 CN20-	5'-GTGACAACATAGTCCCAGTC-3'	NS3 (5.722-5.742)
DENV-1 CN18+	5'-CACACCAGAAGGGATCATCCC-3'	NS3 (6.019-6.041)
DENV-1 CN21-	5'-CGGCGGCTACATGGCCAATCCC-3'	NS4A (6.865-6.884)
DENV-1 CN28+	5'-GATGCGGACCACATGGGCC- 3'	NS4B (7.377-7.396)
DENV-1 CN27-	5'-GGCTTCAGATCTGTCCACCTCC-3'	NS4B (7.675-7.696)
DENV-1 CN30 +	5'- GTGCCACGTGTGTCTACAACATG- 3	NS5 (8.910-8.932)
DENV-1 CN31-	5'-GCTGGTCTTGCACCCTCACTG-3'	NS5 (9.302-9.321)
DENV-1 CN33 +	5'-GGAGAGACCTGAGACTAGCGGC-3'	NS5 (9.875-9.897)
DENV-1 CN15-	5'-CCCCACGATGGAGCCACAGGC-3'	3'UTR (10.433-10.455)
DENV-1 D10 -	5'-CGCTCGAGGCTCTCGAGAACCTGTTGATTCA ACAGC-3'	3'UTR (10.715-10.735)

* contando a partir do 1º nucleotídeo do genoma.

3.9.4 RT/PCR a partir de amostras de RNA viral sem *CAP* e ligado nas extremidades 5'/3' não traduzida (UTR) do genoma

A seqüência nucleotídica da região 5' e 3' UTR do vírus neuroadaptado FGA/NA P6 foi determinada após a remoção do *cap* e posterior ligação do RNA, utilizando-se o kit comercial *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP) (EPICENTRE®). A reação para a remoção do *cap* consistiu de uma mistura de 43 µL de RNA, extraído com o kit comercial *RNeasy mini Kit* (QIAGEN®) conforme descrito no item 3.9.1, 5 µL do tampão comercial de reação (*10x Tap buffer*) e 1 µL de RNase Out (40 U/µL) (Invitrogen®), a qual foi incubada a 37 °C por 1h. Em seguida, foram adicionados 50 µL de água ultrapura DEPC para extração do RNA pela técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, conforme descrito no item 3.9.1. O RNA foi ressuspenso em 43 µL de água ultrapura DEPC. O RNA 5' monofosforilado, resultante, foi ligado a sua região 3' hidroxilada, utilizando-se 1 µL da enzima T4 RNA ligase (20 U/µL) (BioLabs®), 5 µL do tampão comercial 10x, 1 µL da enzima RNase Out (40 U/µL) (Invitrogen®) e 43 µL do RNA. A mistura foi incubada por 30 min. a 37 °C e, em seguida, incubada por 5 min. a 65 °C, para inativar a ação da enzima T4 RNA ligase. Em seguida, foram adicionados 50 µL de água ultrapura DEPC à mistura e o RNA foi precipitado pela técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e ressuspenso em 11,2 µL de água ultrapura DEPC. 5,6 µL do RNA ligado foram misturados com 2,5 µL (100 pmol/µL) de *random primer* e utilizados para a reação de transcriptase reversa, conforme descrito no item 3.9.2,. A fita de cDNA foi sintetizada a 42 °C por 1h. Em seguida, 4 µL do cDNA obtido foram utilizados para cada reação de PCR, conforme descrito no item 3.9.3, utilizando-se 3 µL (5 pmol/µL) do oligonucleotídio iniciador de polaridade positiva CS2 (5'-GTCAATCCATGC-3') e 3 µL (5 pmol/µL) do oligonucleotídio iniciador de polaridade negativa PhD5 (5'-TTTGACCACACGAGGGGAGAGCCACACATGAT-3'). Em outra reação utilizou-se 3 µL (5 pmol/µL) do oligonucleotídio iniciador de polaridade positiva CN26 (5'-GTCAAGGCCGAAAGCCACG-3') e 3 µL (5pmol/µL) do oligonucleotídio iniciador de polaridade negativa D2 (5'-ATTGCACCAGCAGTCAACGTCTGTTTC-3'). O ciclo de amplificação consistiu de uma incubação a 95 °C por 3 min., seguida de 40 ciclos de 95 °C por 30 min, 62 °C por 30 min. e 68 °C por 2 min. Alíquotas das amostras de DNA

amplificadas (1:10) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os amplicons correspondentes às regiões genômicas determinadas foram purificados utilizando-se o kit *High Pure PCR* (Roche®), de acordo com as instruções do fabricante e ressuspensos em 50 µL de água ultrapura, e submetidos ao seqüenciamento nucleotídico com oligonucleotídeos específicos para DENV-1, conforme descrito a seguir.

3.9.5 Seqüenciamento nucleotídeo e análise dos dados de seqüência

Os amplicons obtidos foram seqüenciados, utilizando-se o kit *Thermo Sequenase* (USB Inc., Ohio^{Q2}). Para cada produto de PCR a ser seqüenciado, aproximadamente 100 ng de DNA foi adicionado a uma mistura contendo 0.7 µL (5 pmol/µL) de oligonucleotídeo iniciador específico para DENV-1, 4 µL de *Dye Terminator seqüencing mix* e água ultrapura para volume final de 10 µL. A mistura foi submetida as seguintes condições de temperatura: 1 ciclo de 96 °C por 2 min., seguido de 30 ciclos de 96 °C por 20 seg.; 52 °C por 20 seg. e 60 °C por 4 min. Os oligonucleotídeos utilizados na PCR e outros oligonucleotídeos internos ao fragmento foram utilizados para seqüenciar o fragmento inteiro. As reações de seqüência foram precipitadas com acetato de amônio (1:10) e 50 µL de etanol 100% ao abrigo da luz por 20 min. e, em seguida, centrifugadas a 3.600 rpm por 45 min. Os sobrenadantes foram descartados, os sedimentos lavados com 150 µL de 70% etanol e centrifugados a 3.600 rpm por 15 min. As reações foram incubadas a 37 °C por 20 min., para completa evaporação do etanol, e ressuspensas em 10 µL de formamida. As reações de seqüência foram determinadas em seqüenciador ABI 3100 pelo método BigDye7 Terminator (Applied Biosystems Inc^{Q3}). As seqüências nucleotídicas foram analisadas através do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (www.phrap.org). As seqüências nucleotídicas completas de FGA/89 e BR/01-MR foram retiradas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), através dos números de acesso: **AF226687** e **AF513110**, respectivamente, e utilizadas para análise comparativa com as seqüências nucleotídicas obtidas neste estudo.

O software CLUSTALw (THOMPSON et al., 1994; 1997) foi utilizado para alinhar seqüências e o software MegaAlign (DNASTAR, Inc, ^{Q4}) para quantificar diferenças de nucleotídeos e aminoácidos entre as diferentes cepas virais.

3.10 Estrutura gráfica de proteína

O protótipo da seqüência de FGA/89 foi modelado para o conhecimento da estrutura tridimensional pelo *Swiss-model server* (www.swissmodel.expasy.org). A estrutura 2BMF do domínio RNA helicase de DENV-2 (XU et al., 2005) foi selecionada como a estrutura mais similar e toda a análise tridimensional foi realizada através dessa estrutura utilizando o programa PyMol (DELANO; BROMBERG, 2004).

3.11 RT/PCR quantitativa em tempo real

Para quantificar o RNA viral presente no tecido cerebral de camundongos infectados e na suspensão viral 10 % do tecido cerebral macerado durante o processo de neuroadaptação das cepas FGA/89 e BR/01-MR, realizou-se reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT/PCR), de acordo com o protocolo descrito por Poersch et al., (2005). O RNA presente no tecido cerebral de camundongos 8 dpi de cada uma das seis passagens da cepa FGA/89 neuroadaptada (FGA/NA-P1 a P6) e da sexta e sétima passagens da cepa BR/01-MR neuroadaptada (MR/NA-P6 e P7) foi extraído com o kit comercial *RNeasy mini Kit* (QIAGEN®), conforme descrito no item 3.9.1., eluído em 50 µL de tampão de eluição e utilizado para as reações de quantificação. O RNA presente na suspensão 10% do tecido cerebral das passagens FGA/NA-P1 a P6 foi extraído a partir 70 µL da suspensão 10%, utilizando-se o kit comercial *Qiamp RNA* (QIAGEN®), de acordo com o protocolo do fabricante, eluído em 50 µL de tampão de eluição e utilizado para as reações de quantificação. O RNA extraído do tecido

cerebral do mock (camundongos inoculados com PBS contendo 50 µg/mL gentamicina) foi utilizado como controle negativo da reação.

A qRT/PCR foi realizada no ABI PRISM 7000 *sequence Detection System* (Applied Biosystems®). As amostras foram ensaiadas em 25 µL de reação, contendo 5 µL do RNA extraído e 20 µL da mistura contendo a concentração recomendada de *MultiScribe enzymeplus RNase Inhibitor* e *TaqMan Universal RT-PCR Master Mix* (Applied Biosystems®). Todas as reações continham 200 nM de oligonucleotídeos específicos para DENV-1 e 300 nM da sonda específica para DENV-1 (Tabela 3.2). As condições de temperatura para a PCR consistiram de: 1 ciclo de 48 °C por 30 min. e 1 ciclo de 95 °C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg. e 60 °C por 60 seg.

Os dados da amplificação do RNA viral por qRT/PCR foram normalizados, utilizando-se o gene de expressão constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Mus musculus* (murGAPDH). Para tanto, 5 µL do RNA viral de cada uma das passagens do processo de neuroadaptação foram submetidos a uma reação de transcrição reversa utilizando o kit *Impron II Reverse Transcriptase* (Promega®), conforme descrito no item 3.9.2, e 20 µM do oligonucleotídeo iniciador Oligo(dT). A reação de cDNA foi incubada a 42 °C por 2 h. Para a reação de qRT/PCR, 25 µL da reação, contendo 5 µL do cDNA e a concentração recomendada de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems®) além dos oligonucleotídeos iniciadores específicos de murGAPDH foram submetidas as seguintes condições de temperatura: 50 °C por 2 min., 96 °C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 96 °C for 15 seg. e 62 °C por 60 seg. A curva de dissociação foi utilizada para verificar a especificidade do produto e consistiu de uma incubação em que temperatura foi aumentada de 60 °C a 96 °C numa taxa de aproximadamente 1 °C/40 seg., com leitura contínua da fluorescência.

Tabela 3.2 – Oligonucleotídeos iniciadores e sonda específicas para DENV-1 utilizados nas reações de qRT/PCR

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQÜÊNCIA	REGIÃO GENÔMICA*
DENV-1 polaridade positiva	5'-GCTGATGCTGGTGACACCAT- 3'	E (907-926)
DENV-1 polaridade negativa	5'-TCGACGAAGTCTCTGTTGCCTAT-3'	E (950-972)
DENV-1 sonda	5'-CCCACGCATCGCATGGCCAT- 3'	E (929-948)
MurGAPDH' polaridade positiva	5`- CGACTTCAACAGCAACTCCCACTC- 3`	-
MurGAPDH' polaridade positiva	5`- CACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC- 3`	-

* contando a partir do 1° nucleotídeo do genoma.

• gene de expressão constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Mus musculus*

3.12 RT/*Nested* – PCR

O método de diagnóstico por RT/*Nested*-PCR, estabelecido por Lanciotti et al. (1992), permite a detecção rápida e tipagem dos vírus da dengue e foi utilizado (com pequenas modificações), neste trabalho, para a identificação do vírus da dengue nas passagens 3, 4, 5, 6 e 7 da cepa MR/NA em cérebros de camundongos. O vírus FGA/NA P6 foi utilizado como controle positivo da reação. Uma cinética de infecção do vírus MR/NA-P6 foi realizada para detecção do RNA viral no tecido cerebral de camundongos, através da técnica de RT/*Nested*-PCR. Para tanto, um grupo de 11 animais foi infectado com MR/NA-P5 e em cada ponto da cinética (2 dpi, 4 dpi, 6 dpi e 8 dpi) os cérebros de dois animais eram coletados para extração do RNA com o kit comercial *RNeasy mini Kit* (QIAGEN®), conforme descrito no item 3.9.1. O RNA viral extraído de FGA/NA-P6 foi utilizado como controle positivo nas reações e o RNA extraído do mock em cérebro de camundongos foi utilizado como controle negativo.

O RNA extraído das amostras foi submetido à síntese de uma cadeia de cDNA, descrito no item 3.9.2, utilizando-se 4 µL do RNA viral e 1 µL (32 ng/µL) do oligonucleotídeo iniciador D2, cuja seqüência nucleotídica encontra-se descrita no item 3.9.4. A mistura do RNA com o oligonucleotídeo foi incubada por 1h a 42 °C em um termociclador Eppendorf, Mastercyclers. O cDNA viral foi amplificado por PCR utilizando-se o kit *Taq DNA polimerase* (Invitrogen®). A reação consistiu de: 4 µL da reação de cDNA, 20 µL de uma solução de 2.5 mM de dNTPs, 10 µL de tampão comercial de reação 10x, 3 µL de MgCl₂, 2 µL (320 ng/µL) de cada oligonucleotídeo iniciador D1 modificado (5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3') e D2, complementares a seqüências comuns a todos os sorotipos do vírus da dengue, 1,4 µL da enzima *Taq DNA Polymerase* (5 U/µL) e água ultrapura para volume final de 50 µL. O ciclo de amplificação consistiu de: 1 ciclo de 94 °C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg.; 58 °C por 30 seg. e 72 °C por 1 min. Um segundo ciclo de amplificação (*Nested*-PCR) foi realizado a partir de 1 µL da reação de PCR1 adicionado a uma mistura contendo: 5 µL de uma solução de 2.5 mM de dNTPs, 10 µL de tampão comercial de reação 10x, 3 µL de MgCl₂, 2 µL (320 ng/µL) do oligonucleotídeo iniciador de polaridade positiva D1, 2 µL (320 ng/µL) de cada oligonucleotídeo iniciador de polaridade negativa TS1

(5'-GGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'), TS2 (5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'),
 TS3 (5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'), TS4
 (5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'), 1,4 µL da enzima Taq DNA Polymerase
 (5 U/µL) e água ultrapura para volume final de 50 µL. O ciclo de amplificação
 consistiu de: 1 ciclo de 94 °C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg.;
 60 °C por 30 seg. e 72 °C por 1 min. As amostras (1:10) foram analisados em gel de
 eletroforese 1 %, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

3.13 PCR genérico para flavivírus

O RNA extraído, conforme descrito no item 3.9.1, a partir do tecido cerebral de camundongos infectados com a cepa MR/NA-P6 foi utilizado como molde para a síntese de uma fita de cDNA, conforme descrito item 3.9.2, utilizando-se 4 µL do RNA viral e 2,5 µL (100 pmol/µL) de *random primer*. A fita de cDNA foi sintetizada com uma incubação de 42 °C por 1 h. O RNA viral extraído da cepa FGA/NA-P5 foi utilizado como controle positivo nas reações e o RNA extraído do mock em cérebro de camundongos foi utilizado como controle negativo.

Os cDNAs sintetizados foram utilizado para identificação de vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* pela técnica de PCR, conforme descrito Sánchez-Seco et al., (2005), utilizando-se o kit *TripleMaster PCR System* (Eppendorf®). A reação consistiu de: 5 µL de cDNA, 2,7 µL de uma solução de 2.5 mM de dNTPs, 2 µL de tampão comercial de reação (*10x HighFidelity Buffer with Mg²⁺*), 2 µL (5 pmol/µL) do oligonucleotídio iniciador genérico de flavivírus F1 de polaridade positiva (5'-GATCTCTIGGITGTCGGIIGIGGIGAGITGG-3') e 2 µL (5 pmol/µL) do oligonucleotídio iniciador genérico de flavivírus F1 de polaridade negativa (5'-TCCCAICCGICIGATGATCGATCIGC-3') e 0.3 µL da enzima *Triple Master*® (5 U/µL) e água ultrapura para volume final de 20 µL. A PCR foi submetida aos seguintes ciclos: 1 ciclo de 94 °C por 3 min. seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 seg., 47 °C por 30 seg. e 68 °C por 1 min. e 15 seg. Uma *Nested-PCR* foi realizada a partir de 5 µl da reação de PCR1 adicionado a uma mistura contendo: 2,7 µL de uma solução de 2.5 mM de dNTPs, 2 µL de tampão comercial de reação (*10x HighFidelity Buffer with Mg²⁺*), 2 µL (5 pmol/µL) do oligonucleotídio iniciador

genérico de flavivírus F2 de polaridade positiva (5'-TCGTCGATITCATCAATCATCGCATGGG-3') e 2 μ L (5 pmol/ μ L) do oligonucleotídeo iniciador genérico de flavivírus F2 de polaridade negativa (5'-CAGATGITCTCGTTCGATTIAIGAAAICC-3'), 0.3 μ L da enzima Triple Master® (5U/ μ L) e água ultrapura para volume final de 20 μ L. A PCR foi submetida aos seguintes ciclos de temperatura: 1 ciclo de 94 °C por 3 min. seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 seg., 47 °C por 30 seg. e 68 °C por 20 seg. Alíquotas das amostras de DNA amplificadas (1:10) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio.

3.14 Reação de PCR para identificação dos vírus herpes simples (HSV) e varicella-zoster (VSV)

O DNA extraído a partir de 30 mg de tecido cerebral macerado de um *pool* de três camundongos infectados 8 dpi com a variante MR/NA-P6 foi analisado por PCR para a presença de vírus herpes simples (HSV) e do vírus da varicella-zoster (VZV). As amostras FGA/NA-P6 e mock em cérebro de camundongos foram utilizadas como controles nas reações. O sobrenadante de cultura de células infectadas com isolados clínicos de HSV e VZV foram gentilmente cedidos pelo laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas (HC) de Curitiba e utilizados como controle positivo nas reações. O DNA das amostras foi extraído através da técnica de extração de ácidos nucleicos por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, conforme descrito no item 3.9.2, excluindo-se a etapa de tratamento com DNase.

As reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Johnson et al. (2000), utilizando-se o kit *Taq DNA polimerase* (Invitrogen®). Cada reação consistiu de: 10 μ L de DNA, 5 μ L de uma solução de 2.5 mM de dNTPs, 5 μ L de tampão comercial de reação (*10x Buffer*), 1,5 μ L de MgCl₂, 3 μ L (10 pmol/ μ L) de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO-Sigma) 1 μ L da enzima Taq DNA Polymerase (5U/ μ L) e água ultrapura para volume final de 50 μ L. Os oligonucleotídeos HSV-P2 (5'-GTGGTGGACTTTGCCAGCCTGTACCC-3') e HSV-P2 (5'-TAAACATGGAGTCCGTGTCGCCGTAGATGA-3') foram utilizados para amplificar cinco tipos de vírus herpes humano e os oligonucleotídeos

VZV-P1 (5'-GTCGTGTTTGATTTTCAAAGTTTATATCC-3') e VZV-P2 (5'-ATAAACACACAATCCGTATCACCATAAATAACCT-3') foram utilizados para amplificar três tipos de vírus varicella. O ciclo de amplificação para HSV consistiu de: 1 incubação a 95 °C por 12 min., seguido de 3 ciclos de 95 °C por 1 min., 60 °C por 1 min. e 72 °C por 1 min., 37 ciclos de 95 °C por 1 min., 55 °C por 45 seg. e 72 °C por 1 min. e uma incubação final a 72 °C por 3 min. O ciclo de amplificação para VZV consistiu de: 1 incubação a 95 °C por 10 min., seguido de 40 ciclos de 95 °C por 1 min., 47 °C por 1 min. e 72 °C por 1 min e uma incubação final a 72 °C por 3 min.

3.15 Análise histopatológica e ultra-estrutural dos vírus neuroadaptados

Para avaliar o comprometimento do SNC durante a infecção pelos vírus neuroadaptados e detectar a presença de antígenos virais no tecido cerebral de camundongos infectados i.c. com os vírus FGA/NA P5 e MR/NA P6, analisou-se os cérebros dos animais infectados pelas técnicas de histopatologia e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os cérebros dos animais infectados foram coletados quando os animais apresentaram sinais de paralisia severa de envolvimento do SNC e imediatamente fixado por imersão em fixador apropriado para cada técnica. Os mesmos procedimentos foram realizados fidedignamente com o mock.

3.15.1 Histopatologia

Para a análise histológica, os tecidos cerebrais dos camundongos infectados foram fixados em formalina 10% em água destilada e deionizada por no mínimo 24 h, em seguida desidratados em banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90% e dois banhos em álcool 100%, diafanizados em três banhos de xilol e impregnados por três banhos em parafina líquida a 65 °C, todos por 1 h, utilizando-se o equipamento histotécnico marca Leica, modelo TP1020. As amostras foram então incluídas em

parafina utilizando-se o inclusor marca Leica, modelo EG1160. Os cortes histológicos com cerca de 5 micrômetros foram obtidos utilizando-se micrótomo marca Leica, modelo RM2145. Os cortes histológicos em parafina foram cuidadosamente estirados em banho-maria a 60 °C, colocados em lâmina de vidro com albumina, para aderência do corte histológico à lâmina, e secos em estufa a 60 °C por aproximadamente 1 h. Posteriormente, as lâminas contendo os cortes histológicos foram submetidas aos processos de desparafinização, desidratação e re-hidratação. A desparafinização consistiu de três banhos sucessivos de 5 min. com xilol aquecido, enquanto a desidratação consistiu de três banhos sucessivos de 2 min. com álcool etílico absoluto, sendo então os cortes re-hidratados com água por 10 min. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (coloração básica para núcleo e citoplasma das células), analisados em microscópio de luz Nikon Eclipse E600 e fotografados utilizando-se o programa Image-Pro® Plus versão 4.5 em aumentos variáveis.

3.15.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET), os tecidos cerebrais dos camundongos infectados foram retirados cuidadosamente e imediatamente fixados por imersão em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Os tecidos foram cuidadosamente cortados em pedaços menores e os espécimes do lóbulo esquerdo do cérebro dos camundongos, de aproximadamente 1x2 mm, foram selecionados para processamento e análise por MET. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, e submetidas à uma pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato 0,1 M, contendo 0,8% de ferricianeto de potássio e 5 mM de CaCl_2 . Após a fixação, os espécimes foram desidratados por dois banhos sucessivos de 10 min. para cada concentração crescente de acetona 50%, 70%, 90% e 100%. Em seguida, os espécimes foram incluídos em resina PolyBed-812. A etapa de inclusão consistiu de uma incubação de 1h com uma mistura de 1:1 de acetona 100% e resina PolyBed-812, seguida de uma incubação com resina pura, para completa retirada da acetona do tecido e substituição pelo meio de inclusão. Os espécimes foram emblocados em

cápsula Beem a 60 °C por 72 h. Os cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos utilizando-se ultra-micrótomo automático (Leica Ultracut R) e colhidos sobre uma grade de cobre de 300 mesh. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila a 5% em água destilada durante 40 min., em seguida lavados com água destilada, e então corados com citrato de chumbo (0,13 M de nitrato de chumbo e 0,13 M citrato de sódio) durante 5 min. Os cortes ultrafinos foram observados em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol operando a 80 kV e imagens digitais foram adquiridas com o programa Gatan Digital Micrograph versão 3.65 (1999) em aumentos variáveis.

3.15.3 Imunocitoquímica ultra-estrutural

Os anticorpos monoclonais anti-E (4G2), grupo específico para flavivírus, e anti-NS1, específico para os quatro sorotipos do vírus da dengue (G18-1b), foram utilizados para identificar partículas virais no tecido cerebral de camundongos infectados i.c. com os vírus FGA/NA-P5 e MR/NA-P6, através da MET utilizando-se o método de marcação com anticorpos secundários acoplados a partículas de ouro coloidal. Para essa reação, o tecido cerebral dos camundongos foi cuidadosamente retirado da calota craniana e fixado durante 2 h em paraformaldeído 4%/ glutaraldeído 1% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, preparado no momento do uso. Os espécimes do lóbulo esquerdo do cérebro dos camundongos, de aproximadamente 1x2 mm, foram desidratados pelo método de redução da temperatura em banhos sucessivos de concentrações crescentes de etanol 30% por 30 min. a 4 °C, etanol 50 % por 1 h a 4 °C, etanol 70 % por 1 h a - 20 °C, etanol 90% por 1h a - 20 °C e etanol 100% por 1h a - 20 °C. Após a última etapa de desidratação, os espécimes foram incluídos lentamente na resina Lowicryl MonoStep HM20 a baixa temperatura. A etapa de inclusão consistiu de: (a) uma incubação dos espécimes em uma mistura composta de Lowicryl HM20 e etanol na proporção 1:2 a - 20 °C por no mínimo 18 h; (b) uma incubação com uma mistura composta de Lowicryl HM20 e etanol na proporção 1:1 a - 20 °C durante 18 h, e (c) duas incubações com a resina Lowicryl HM20 pura a - 20 °C durante 18 h. Os

espécimes foram emblocados em cápsulas de polipropileno com a resina Lowicryl HM20, a qual foi polimerizada por irradiação ultravioleta a -20°C por 4 dias. Os cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos utilizando-se ultra-micrótomo automático (Leica Ultracut R) e colhidos sobre uma grade de níquel de 300 mesh. As grades contendo os cortes foram incubadas com uma solução de cloreto de amônio (50 mM) em PBS, pH 7,4, durante 30 min. a temperatura ambiente, para bloqueio de grupamentos aldeídicos livres presentes nas amostras fixadas. Em seguida, as grades foram incubadas em PBS contendo 1,5 % de albumina bovina (BSA) e 0,01 % Tween 20 (PBS-BSA-Tw) pH 7,4, durante 30 min. a temperatura ambiente, para hidratação dos cortes e bloqueio de grupamentos reativos. Após o período de incubação na solução de bloqueio, as grades foram incubadas durante 1 h a temperatura ambiente com os anticorpos monoclonais 4G2 e anti-NS1 G18-1b diluídos a 1:20 em PBS-BSA-Tw. As grades foram submetidas a dois ciclos de lavagem por imersão em PBS-BSA-Tw de 10 min. cada e incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-mouse marcado com partículas de ouro de 10 nm diluído a 1:20 em PBS-BSA-Tw. As grades foram subsequentemente lavadas com PBS-BSA-Tw e água destilada e contrastadas com acetato de uranila (5% em água) e citrato de chumbo (0,13 M de nitrato de chumbo e 0,13 M citrato de sódio), conforme descrito no item 3.15.2. Os cortes controle foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos acima, mas incubados apenas com anticorpos secundários anti-camundongo marcados com partículas de ouro de 10 nm. Os cortes ultrafinos foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol operando a 80 kV e imagens digitais foram adquiridas com o programa Gatan Digital Micrograph versão 3.65 (1999) em variáveis.

3.16 Obtenção de estoque viral

3.16.1 Isolamento viral

O vírus FGA/NA-P6 foi amplificado em células C6/36 para produção de estoque viral e posterior análise de infectividade. As células C6/36 plaqueadas em garrafas de 25 cm² ou 150 cm², contendo 5×10^5 e 7×10^6 células, respectivamente,

foram inoculadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1 de cada cepa viral em meio de cultura L15 sem SFB. O inóculo foi incubado com as células por 1 h a 28 °C em estufa BOD sendo em seguida substituído por meio de cultura L15 completo e incubado em estufa a 28 °C. A infecção viral foi observada através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) com anticorpos poli ou monoclonais específicos para DENV-1. Após a detecção da positividade por imunofluorescência, a infecção foi recolhida pela técnica de raspagem física com auxílio de raspadores descartáveis (Cell Scraper – Nunc). Os sobrenadantes contendo as células em suspensão foi acondicionado em tubos tipo Falcon e centrifugados a 2.000 rpm por 10 min. a 4 °C, para obtenção de sobrenadantes clarificados e dos sedimentos celulares. Os sobrenadantes foram precipitados e purificados em gradiente de sacarose e os sedimentos celulares armazenados a – 70 °C.

3.16.2 Imunofluorescência indireta (IFI)

Para análise da infecção por imunofluorescência, uma pequena porção da monocamada celular das células C6/36 foi levemente raspada com o auxílio de uma ponteira de micropipeta e depositada em duplicata sobre a lâmina de vidro/teflon para imunofluorescência. A monocamada das células Neuro2A e Vero foram levemente raspadas com o auxílio de uma ponteira de micropipeta e depositadas em um tubo eppendorf e centrifugadas a 5.000 rpm por 1min. O pellet de células foi lavado duas vezes em PBS e tripsinizado a 37 °C por 1 min. Em seguida, adicionou-se o mesmo volume de meio contendo 5% de SFB e as células centrifugadas a 5.000 rpm por 1 min. As células ressuspensas em PBS foram depositadas em duplicata sobre a lâmina de vidro/teflon para imunofluorescência.

As células foram secas a temperatura ambiente e, em seguida, fixadas com solução de metanol P.A. por 3 min. e incubadas com anticorpos policlonais monoespecíficos contra DENV-1, Hawaii, (1:100 em PBS) por 1 h a 37 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS/0,2% gelatina à temperatura ambiente e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado com FITC-Sigma (1:100 em PBS) por 30 min. a 37 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e montadas com PBS/glicerol sobre as amostras e

cobertas com lamínula de vidro. As lâminas foram observadas em microscópio óptico de fluorescência (Eclipse E600, Nikon).

3.16.3 Purificação viral em gradiente de sacarose

Sobrenadantes de culturas celulares infectadas foram precipitados com 7% de polietileno glicol (PEG P.M. 8.000) e 2,3% NaCl por 16 horas a 4 °C. Os sedimentos contendo as partículas virais foram obtidos por centrifugação a 10.000 rpm por 30 min. a 4 °C e ressuspensos em 3 mL de tampão TNE e adicionados sobre gradientes descontínuos de sacarose 60 % e 30 %. O material era centrifugado em ultracentrífuga (Itachi) a 39.000 rpm por 2 h. Após a ultracentrifugação, as bandas contendo os vírus concentrados eram visualizadas com o auxílio de um anteparo escuro e coletadas com pipetas Pasteur e armazenados em freezer – 70 °C.

3.17 Caracterização biológica do vírus neuroadaptado FGA/NA P6

Após a purificação, o vírus FGA/NA P6 foi titulado por FIA em células C6/36, conforme descrito no item 3.8, e a produção de partículas infecciosas avaliada pela infecção em cultura de células de linhagens distintas, e sua letalidade testada pela inoculação i.c. em camundongos suíços neonatos.

Para a infecção em cultura celular, as células C6/36, Neuro2a e Vero foram semeadas em placas de 6 poços para conter $2,1 \times 10^5$, 6×10^4 e 6×10^4 células/poço, respectivamente, e infectadas, conforme descrito no item 3.16.1, com MOI de 10. O curso da infecção viral foi avaliada pela técnica de IFI, descrita no item 3.16.2.

Para avaliar a estabilidade do fenótipo de neurovirulência, um grupo de 10 camundongos suíços neonatos (até 48 h após o nascimento) foi infectado i.c. com uma dose de 1.0×10^5 FFU_{C6/36}/40 µL do vírus FGA/NA P6 purificado diluído em meio L-15 sem SFB. Os animais foram acompanhados por 21 dpi e a morbidade e mortalidade reportadas.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização biológica dos vírus dengue durante o processo de neuroadaptação em modelo murino

4.1.1 Neuroadaptação do vírus FGA/89

O vírus FGA/89 foi neuroadaptado através de passagens sucessivas em cérebros de camundongos suíços neonatos, utilizando uma metodologia similar a descrita por Desprès et al. (1998). O objetivo principal foi relacionar a aquisição do fenótipo de neurovirulência com alterações genéticas nas proteínas E e NS3 que pudessem eventualmente estar envolvidas neste processo.

O fenótipo de neurovirulência foi evidenciado durante a terceira passagem em cérebro de camundongos, quando 100% dos animais desenvolveram encefalite e evoluíram para morte. Na quarta e quinta passagem somente, 66,6% e 42,9%, respectivamente, dos animais infectados apresentou sinais de encefalite e morte. Na sexta passagem, 100% dos animais infectados desenvolvem encefalite e nenhum animal sobreviveu mais do que 15 dpi. Durante o processo de neuroadaptação, a mortalidade dos camundongos infectados foi observada entre 9 e 17 dpi (Fig.4.1). Os sinais de encefalite ocasionados pela infecção dos vírus FGA/89 neuroadaptados (FGA/NA) foram identificados, principalmente, pela paralisia progressiva dos membros posteriores e, geralmente, precederam a morte do animal em 3 dias.

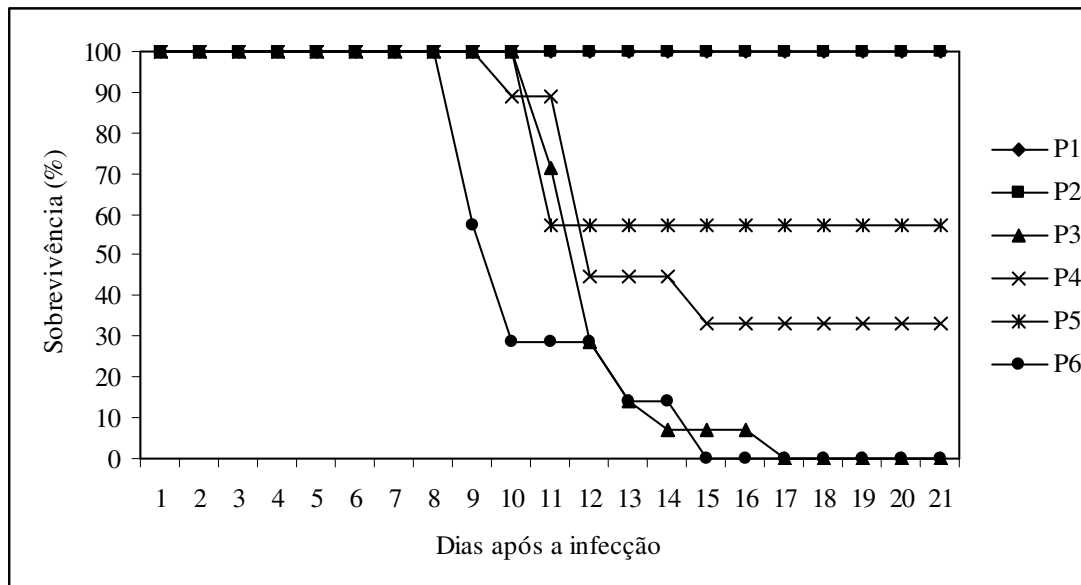


Fig. 4.1. Sobrevivência de camundongos durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89. Os camundongos infectados via i.c. foram observados por 21 dias e a mortalidade registrada. P: Passagem 1 a 6 em cérebro de camundongos.

Para avaliar a habilidade dos DENV-1 replicar e produzir partículas infecciosas no cérebro de camundongos ao longo do processo de neuroadaptação, a produção de progênie viral e a taxa de RNA viral no tecido cerebral de camundongos com 8 dpi foram determinadas durante todo o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89, através das técnicas de titulação viral por FIA e qRT/PCR, respectivamente. A progênie viral nas diferentes passagens em cérebro de camundongos do vírus FGA/89 foi quantificada em $2,3 \times 10^4$ FFU/ml_{C6/36} na passagem P2, $5,0 \times 10^4$ FFU/ml_{C6/36} na P3, $4,2 \times 10^4$ FFU/ml_{C6/36} na P4, $1,2 \times 10^4$ FFU/ml_{C6/36} na P5 e $6,7 \times 10^5$ FFU/ml_{C6/36} na P6 (Fig. 4.2). Não foi possível detectar o título viral na passagem P1 do vírus FGA/89 através da técnica de FIA. No entanto, os níveis de RNA viral foram quantificados por qRT/PCR em todas as passagens do vírus FGA/89 tanto no tecido cerebral quanto na suspensão viral 10% do tecido cerebral. O RNA presente na suspensão viral 10% do tecido cerebral de cada uma das passagens do vírus FGA/89 foi quantificado para estimar e correlacionar a quantidade de RNA viral inoculada com a quantidade de RNA replicado no tecido cerebral de camundongos neonatos. Na tabela 4.1 são mostrados os dados normalizados da quantificação do RNA viral no tecido cerebral e na suspensão viral 10% do tecido cerebral. Os mais altos níveis de RNA viral presente no tecido

cerebral de camundongos durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89 foram observados na terceira e sexta passagem do vírus FGA/89 (FGA/NA P3 e FGA/NA P6). Interessantemente, os níveis de RNA viral e progênie viral no tecido cerebral de camundongos infectados apresentam as mesmas flutuações das taxas de mortalidade observadas durante o processo neuroadaptação do vírus FGA/89 (Fig. 4.2).

Tabela 4.1. Quantificação do RNA viral normalizado durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89

Passagem	Tecido cerebral		Suspensão viral 10%	
	RNA viral/RNA GAPDH	RNA viral/RNA GAPDH	RNA viral/RNA GAPDH	RNA viral/RNA GAPDH
FGA/NA P1	20,2		17,8	
FGA/NA P2	26,7		10,7	
FGA/NA P3	61,7		67,6	
FGA/NA P4	40,9		16,0	
FGA/NA P5	32,2		23,3	
FGA/NA P6	97,2		69,3	

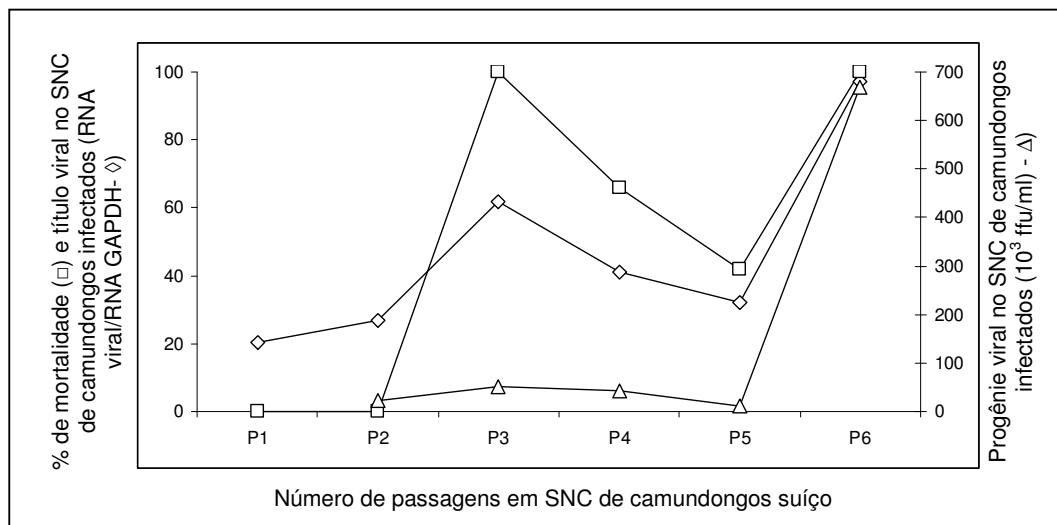


Fig. 4.2 - Taxa de mortalidade, progênie viral e RNA viral no SNC de camundongos infectados durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89.

4.1.2 Caracterização genômica dos vírus FGA/NA

Os genes que codificam para as proteínas E e NS3 das passagens P1, P3 e P5 e o genoma viral completo das passagens P2, P4 e P6 foram amplificados a partir do RNA viral extraído dos cérebros de camundongos 8 dpi (Fig. 4.3) e seqüenciados para determinar a seqüência nucleotídica de cada uma das passagens do vírus FGA/89 em cérebro de camundongos.

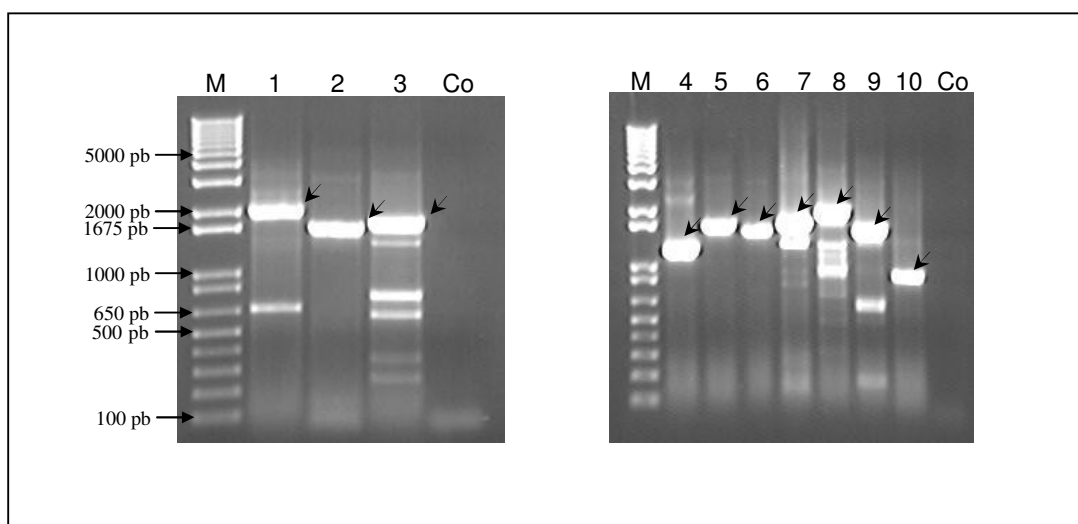


Fig. 4.3 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação independente dos genes que codificam para as proteínas E (1) e NS3 (2 e 3) e para o restante do genoma (4 a 10) das passagens do vírus FGA/89 em cérebro de camundongos. **M.** Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder. **1.** DENV-1 M5' CN12, **2.** DENV-1 NS2b CN20, **3.** DENV-1 28Mer CN21, **4.** DENV-1 5'SP6 EcoApa, **5.** DENV-1 PhD20 CN13, **6.** DENV-1 CN11 CN2, **7.** DENV-1 CN18 CN27, **8.** DENV-1 CN28 CN31, **9.** DENV-1 CN15 CN30, **10.** DENV-1 D10 CN33, **Co.** controle negativo.

As seqüências nucleotídicas dos genes correspondentes as proteínas E e NS3 de FGA/NA P1 e P2 não apresentaram mutações de aminoácidos. Porém duas substituições silenciosas nos nucleotídeos T/C₂₃₁₇ e C/T₂₃₁₈ da proteína E foram identificadas em FGA/NA P1 e se mantiveram até a sexta passagem. No genoma das passagens FGA/NA P4 e FGA/NA P6, que foram completamente seqüenciados, foram identificadas duas outras mutações silenciosas: A/G₃₂₅ na proteína C, também detectada em FGA/NA P2, e G/A₃₆₉₄ na proteína NS2A.

Além das mutações silenciosas, uma substituição de aminoácido na posição 402 da proteína E (E₄₀₂) e duas substituições de aminoácidos na proteína NS3, nas posições 209 (NS3₂₀₉) e 480 (NS3₄₈₀) foram identificadas, primeiramente em FGA/NA P3. Das mutações identificadas, apenas a mutação NS3 (Leu₄₈₀/Ser) confere alteração no caráter do resíduo do aminoácido, mudando de um aminoácido hidrofóbico para polar não carregado. Essas mutações se mantiveram invariavelmente até a sexta passagem (Tabela 4.2). A região 3' UTR e 5' UTR de FGA/NA P6 foi avaliada e era idêntica a região 3' UTR e 5' UTR dos vírus FGA/89 e FGA/NA d1d. Todas as mutações observadas durante o processo de neuroadaptação estão apresentadas na tabela 4.3.

Tabela 4.2. Substituições de aminoácido nas proteínas E e NS3 observadas durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89, comparadas com o vírus parental

Vírus	E		NS3			
	Domínio III		Domínio I helicase			
FGA/89	Phe ₄₀₂	TTC	Val ₂₀₉	GTC	Leu ₄₈₀	TTA
FGA/NA P1 – P2	Phe ₄₀₂	. . .	Val ₂₀₉	. . .	Leu ₄₈₀	. . .
FGA/NA P3 – P6	Leu ₄₀₂	C .	Ile ₂₀₉	A .	Ser ₄₈₀	. C .

A substituição de aminoácido conservativa na proteína E Phe₄₀₂/Leu mapeia no domínio III da proteína E, na região que antecede a α -hélice 1 anfipática (H1^{pred}, aminoácidos 399 a 412) (ALLISON et al., 1999), na mesma região que mapeia a substituição E₄₀₅ Thr/Ile identificada em outra variante neuroadaptada (FGA/NA d1d) também obtida a partir do vírus FGA/89 (Genbank número de acesso **AF226686**) (DUARTE DOS SANTOS et al., 2000).

Para mapear e comparar as substituições de aminoácidos na região C-terminal da proteína NS3, um modelo tridimensional foi obtido por homologia com a estrutura de alta resolução do domínio helicase da proteína NS3 do DENV-2 (cepa TSV01 Genbank número de acesso **AY037116**) (XU et al., 2005) (Fig. 4.4). A substituição de aminoácido não conservativa Leu/Ser na posição NS3₄₈₀ detectada na variante FGA/NA P6 mapeia na região C-terminal do domínio II (resíduos 327 a 481) helicase da proteína NS3 no β -*harpin* que emerge do motivo VI da superfamília

II de RNA helicases (SAMPATH et al., 2006), mesmo domínio da substituição Leu/Ser na posição NS3₄₃₅, identificada nas variantes neurovirulentas FGA/NA d1d e FGA/NA a5c (Genbank número de acesso **EF122232**) (DUARTE DOS SANTOS et al., 2001; BORDIGNON et al., 2007). A mutação na posição NS3₄₈₀ identificada em FGA/NA P6 envolve os mesmos aminoácidos (Leu/Ser) identificados na posição NS3₄₃₅ dos vírus neuroadaptados FGA/NA d1d e FGA/NA a5c. A substituição conservativa Val/Ile do aminoácido NS3₂₀₉, identificada em FGA/NA P6, mapeia na α -hélice 1 do domínio I (resíduos 181 a 326).

Tabela 4.3. - Mutações identificadas nos genomas virais durante o processo de neuroadaptação

Vírus	Sequência genômica	Posição do nucleotídeo (FGA89/FGA/NA)	Posição do aminoácido (FGA89/FGA/NA)
FGA/NA P1	E/NS3	E ₂₃₁₇ <u>ATT</u> /AT <u>C</u>	E ₄₆₁ Ile*
		E ₂₃₁₈ <u>CTG</u> /IT <u>G</u>	E ₄₆₂ Leu*
FGA/NA P2	Completa	C ₃₂₅ <u>GCA</u> /G <u>CG</u>	C ₇₇ Ala*
		E ₂₃₁₇ <u>ATT</u> /AT <u>C</u>	E ₄₆₁ Ile*
FGA/NA P3	E/NS3	E ₂₃₁₈ <u>CTG</u> /IT <u>G</u>	E ₄₆₂ Leu*
		E ₂₁₃₈ <u>ITC</u> /C <u>TC</u>	E ₄₀₂ Phe/Leu
		NS3 ₅₁₄₄ <u>GTC</u> /A <u>TC</u>	NS3 ₂₀₉ Val/Ile
		NS3 ₅₉₅₈ <u>TIA</u> /T <u>CA</u>	NS3 ₄₈₀ Leu/Ser
		C ₃₂₅ <u>GCA</u> /G <u>CG</u>	C ₇₇ Ala*
FGA/NA P4	Completa	E ₂₃₁₇ <u>ATT</u> /AT <u>C</u>	E ₄₆₁ Ile*
		E ₂₃₁₈ <u>CTG</u> /IT <u>G</u>	E ₄₆₂ Leu*
		E ₂₁₃₈ <u>ITC</u> /C <u>TC</u>	E ₄₀₂ Phe/Leu
		NS2A ₃₆₉₄ <u>ACG</u> /A <u>CA</u>	NS2A ₇₃ Thr*
		NS3 ₅₁₄₄ <u>GTC</u> /A <u>TC</u>	NS3 ₂₀₉ Val/Ile
		NS3 ₅₉₅₈ <u>TIA</u> /T <u>CA</u>	NS3 ₄₈₀ Leu/Ser
FGA/NA P5	E/NS3	E ₂₃₁₇ <u>ATT</u> /AT <u>C</u>	E ₄₆₁ Ile*
		E ₂₃₁₈ <u>CTG</u> /IT <u>G</u>	E ₄₆₂ Leu*
		E ₂₁₃₈ <u>ITC</u> /C <u>TC</u>	E ₄₀₂ Phe/Leu
		NS3 ₅₁₄₄ <u>GTC</u> /A <u>TC</u>	NS3 ₂₀₉ Val/Ile
		NS3 ₅₉₅₈ <u>TIA</u> /T <u>CA</u>	NS3 ₄₈₀ Leu/Ser
FGA/NA P6	Completa	C ₃₂₅ <u>GCA</u> /G <u>CG</u>	C ₇₇ Ala*
		E ₂₃₁₇ <u>ATT</u> /AT <u>C</u>	E ₄₆₁ Ile*
		E ₂₃₁₈ <u>CTG</u> /IT <u>G</u>	E ₄₆₂ Leu*
		E ₂₁₃₈ <u>ITC</u> /C <u>TC</u>	E ₄₀₂ Phe/Leu
		NS2A ₃₆₉₄ <u>ACG</u> /A <u>CA</u>	NS2A ₇₃ Thr*
		NS3 ₅₁₄₄ <u>GTC</u> /A <u>TC</u>	NS3 ₂₀₉ Val/Ile
NS3 ₅₉₅₈ <u>TIA</u> /T <u>CA</u>	NS3 ₄₈₀ Leu/Ser		

* mutação silenciosa

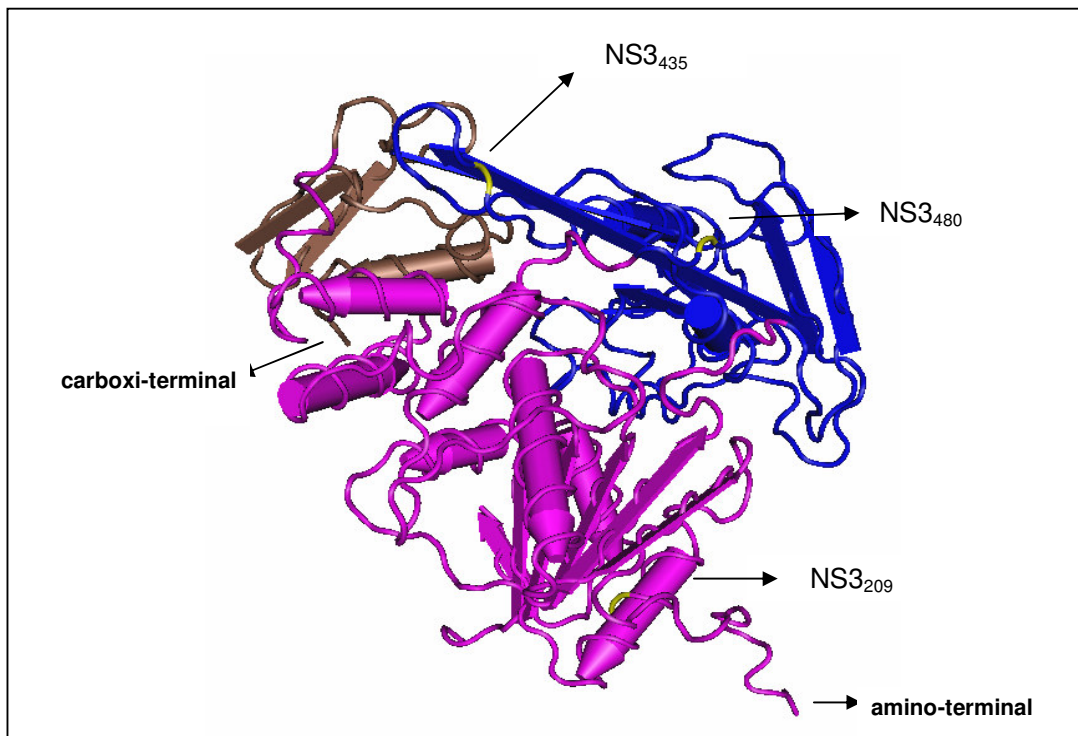


Fig. 4.4 - Representação diagramática da estrutura do domínio helicase da proteína NS3 do vírus DEN-2. A proteína foi baseada na estrutura cristalográfica de alta resolução do domínio helicase da proteína NS3 do vírus DENV-2 (XU et al., 2005). As mutações NS3₂₀₉ Val/Ile e NS3₄₈₀ Leu/Ser, observadas em FGA/NA P6, e NS3₄₃₅, observada em FGA/NA d1d e a5c, estão identificadas na cor amarela. As cores rosa, azul e marrom representam os domínios I, II e III, respectivamente.

As mutações de aminoácidos observadas durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89, surgiram na mesma passagem (P3) em que os animais apresentaram os primeiros sinais de doença e morte e persistiram durante todo o processo, até a sexta passagem (P6), evidenciando a importância dessas mutações para a aquisição e manutenção do fenótipo de neurovirulência em camundongos neonatos.

Altas taxas de erro da RNA polimerase viral (10^{-3} a 10^{-5} /nucleotídeos/ciclo) e a alta pressão seletiva para a replicação do vírus da dengue em um ambiente diferente, tal como o SNC de camundongos neonatos, são provavelmente o principal mecanismo responsável pelo aparecimento de populações neuroadaptadas (DOMINGO; HOLLAND, 1997; CROTTY et al., 2001). As seqüências nucleotídicas do RNA viral de todas as passagens revelaram uma seqüência consenso predominante, no entanto, uma mistura de diferentes populações de moléculas de RNA era observada nos eletroferogramas ao longo do processo de neuroadaptação

(Fig. 4.5), sugerindo a ocorrência do fenômeno de quasispécie. Na seqüência de FGA/NA P6 quase não se observa mais a heterogeneidade de seqüências nucleotídicas em determinadas posições, sugerindo que o genoma tenha estabilizado na sexta passagem. A interação entre diferentes variantes virais no tecido cerebral de camundongos poderia ser uma explicação para a flutuação na mortalidade observada durante a neuroadaptação da cepa FGA/89.

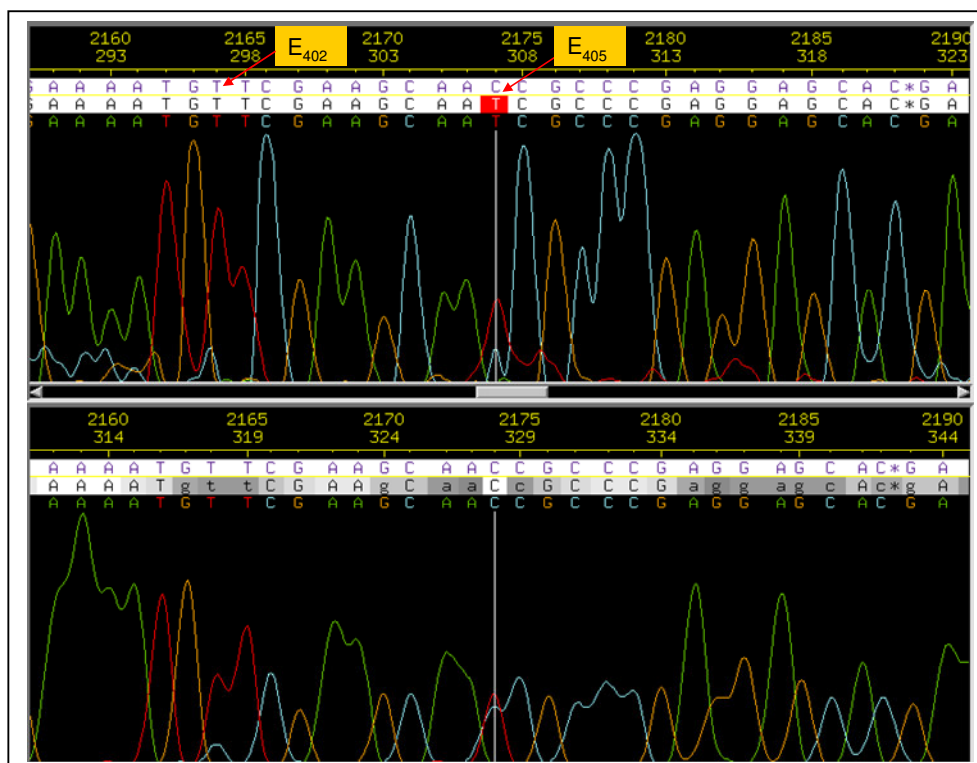


Fig. 4.5 – Fenômeno de quasispécie observado durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89. O eletroferograma da seqüência nucleotídica de FGA/NA P2 foi obtido através do pacote de programas Phred/Phrap/Consed. A mistura de nucleotídeos na posição 2.138 da seqüência nucleotídica de DENV-1, posição que codifica o aminoácido E₄₀₅, sugere a presença de subpopulações virais no tecido cerebral de camundongos durante o processo de neuroadaptação do vírus FGA/89.

Após a sexta passagem em cérebro de camundongos, o vírus FGA/NA P6 foi amplificado por duas passagens sucessivas em células de linhagem C6/36 e purificado em gradiente de sacarose, para a obtenção de estoque viral, e titulado em células C6/36. O título viral de FGA/NA P6 concentrado e purificado foi de 1.0×10^8 FFU/mL. O vírus purificado foi desafiado em cérebro de camundongos neonatos com a mesma dose inicial de 1.0×10^5 FFU/camundongo, utilizada para o

processo de neuroadaptação da cepa FGA/89. Os sinais de doença apareceram por volta de 8 dpi e a mortalidade foi observada entre 9 e 11 dpi.

O vírus FGA/NA P6 purificado foi utilizado para infectar células de diferentes linhagens e avaliar a habilidade de infecção e produção de progênie viral, quando comparado com o vírus parental FGA/89. As células de inseto C6/36 e as células de mamíferos Neuro2a e Vero foram desafiadas com um MOI de 10 da cepa parental FGA/89 e da variante neuroadaptada FGA/NA P6. As infecções foram acompanhadas por reações de imunofluorescência indireta e reveladas com anticorpos monoclonais (4G2) grupo específico para flavivírus (Fig. 4.6).

A infecção *in vitro*, demonstrou que a variante FGA/NA P6 infecta eficientemente células de inseto da linhagem C6/36 e apresentam uma importante habilidade na síntese de proteínas virais nessa linhagem celular, evidenciada pelo número de células fluorescentes positivas. As células de mamífero da linhagem Neuro2a e Vero também são susceptíveis a infecção pelo vírus FGA/NA P6. No entanto, a infecção *in vitro* das células C6/36, Neuro2a e Vero com os vírus FGA/89 e FGA/NA P6 não mostrou diferença significativa no número de células positivas para a infecção viral. As células infectadas tanto com o vírus FGA/NA P6 quanto com o vírus parental não apresentaram efeito citopático e eram indistinguíveis visualmente do controle negativo da infecção. Após 6 dias de infecção os vírus presentes nos sobrenadantes das culturas foram recolhidos e armazenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior titulação viral em células C6/36, e dessa forma, quantificar e comparar a produção de partículas virais entre a cepa neuroadaptada e o vírus parental, em cada tipo celular.

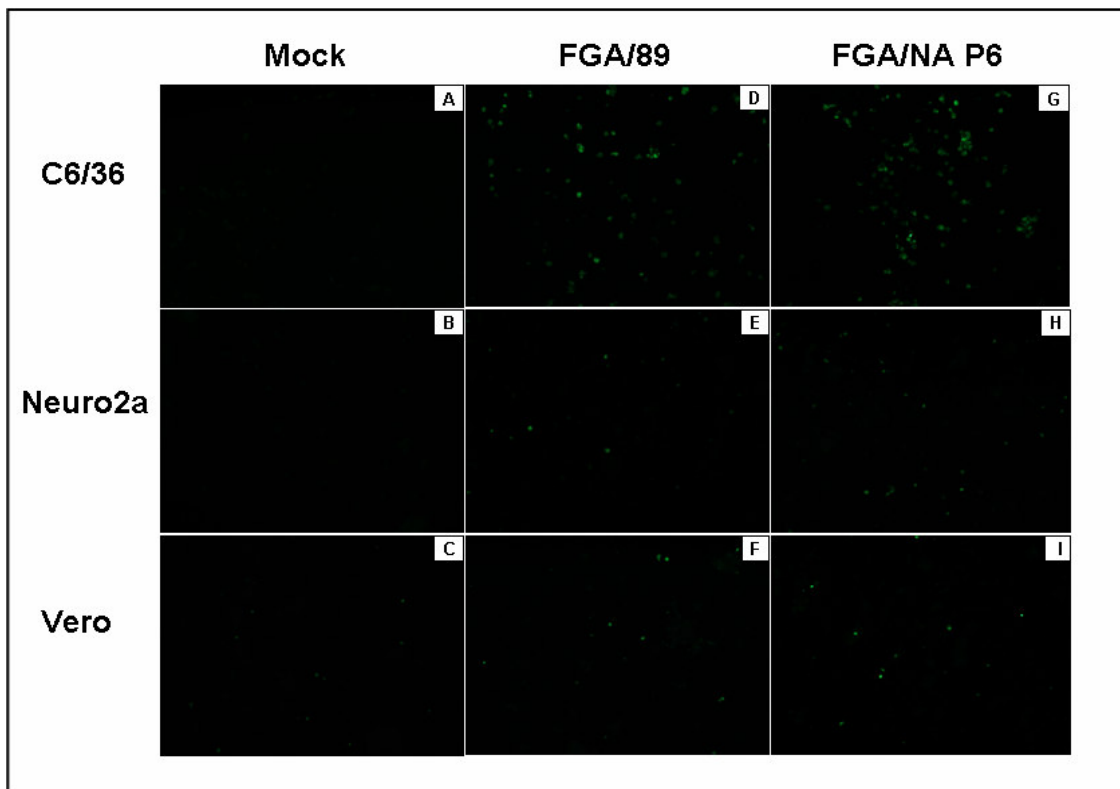


Fig. 4.6 Imunofluorescência indireta (IFI) de células infectadas com os vírus FGA/89 e FGA/NA P6 4 dpi. As imunofluorescências foram reveladas com anticorpos monoclonais grupo específico para flavivírus (4G2) e anticorpos secundário anti-camundongo conjugado com FITC. Controle negativo da infecção em C6/36 (A.), Neuro2a (B.) e Vero (C.). Infecção do vírus FGA/89 em C6/36 (D.), Neuro2a (E.) e Vero (F.). Infecção de FGA/NA P6 em C6/36 (G.), Neuro2a (H.) e Vero (I.). As imagens foram feitas em um NIKON ECLIPSE E600 (Nikon, Inc., Melville, NY) com Olympus BX 50 com Image-Pro® Plus software versão 4.5 (Maryland, USA) em aumento de 20x.

4.2 Neuroadaptação do vírus BR/01-MR

Para confirmarmos o envolvimento das mutações observadas nas cepas FGA/NAP6, FGA/NA_{d1d} e FGA/NA_{a5c} no processo de neuroadaptação decidimos repetir todo o protocolo utilizando outra cepa de DENV-1, BR/01-MR, um isolado clínico recente proveniente do estado do Paraná.

O fenótipo de neurovirulência foi evidenciado na quarta passagem da infecção de cérebros de camundongos, quando 100% dos animais desenvolveram encefalite e evoluíram para morte. A neuropatogênese e a mortalidade dos animais se mantiveram ao longo das passagens subseqüentes do vírus BR/01-MR

neuroadaptado (MR/NA) em cérebro de camundongos (Fig. 4.7). No entanto, não se evidenciou flutuação na taxa de mortalidade dos animais nas diferentes passagens, como observado no processo de neuroadaptação do vírus FGA/89. A mortalidade dos animais infectados durante o processo de neuroadaptação foi observada entre 10 e 17 dpi, sendo que na sexta passagem nenhum animal sobreviveu mais do que 12 dpi (Fig.4.8). Os sinais de encefalite observado nos animais infectados com os vírus MR/NA P4-P6 e o tempo de aparecimento dos sinais de doença eram distintos daqueles observados nos animais inoculados com o vírus FGA/NA P3-P6. Os sinais de doença se tornavam mais severos à medida que uma nova passagem do vírus MR/NA era realizada. Os principais sinais de doença apresentados pelos animais infectados com MR/NA eram caracterizados por apatia, curvamento da coluna vertebral, severo tremor e paralisia progressiva dos membros posteriores. Estes sinais precederam a morte dos animais em 2 a 3 dias.

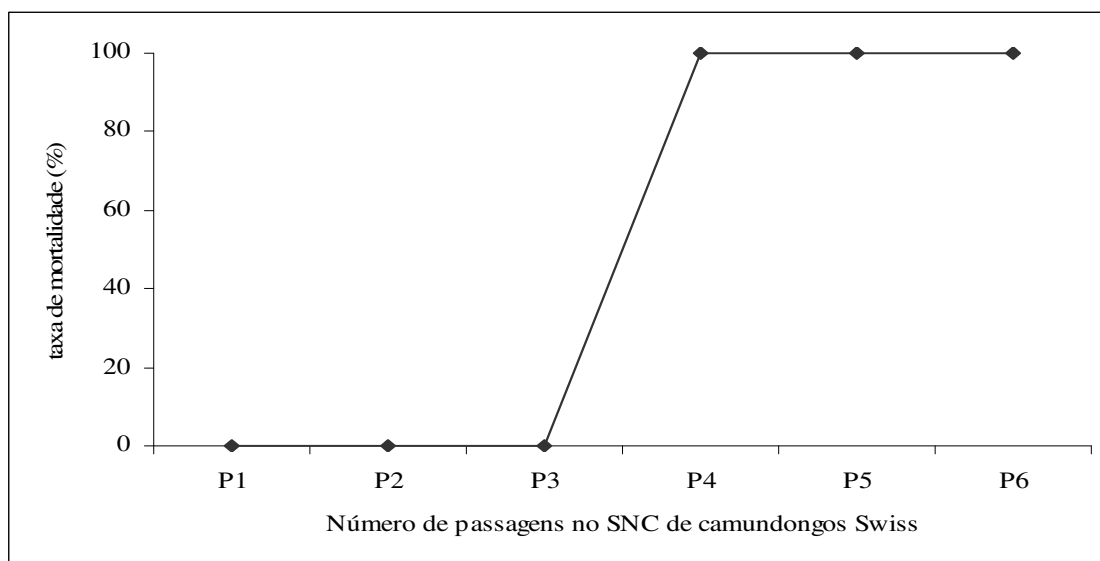


Fig. 4.7 - Taxa de mortalidade de camundongos neonatos durante o processo de neuroadaptação do vírus BR-01/MR.

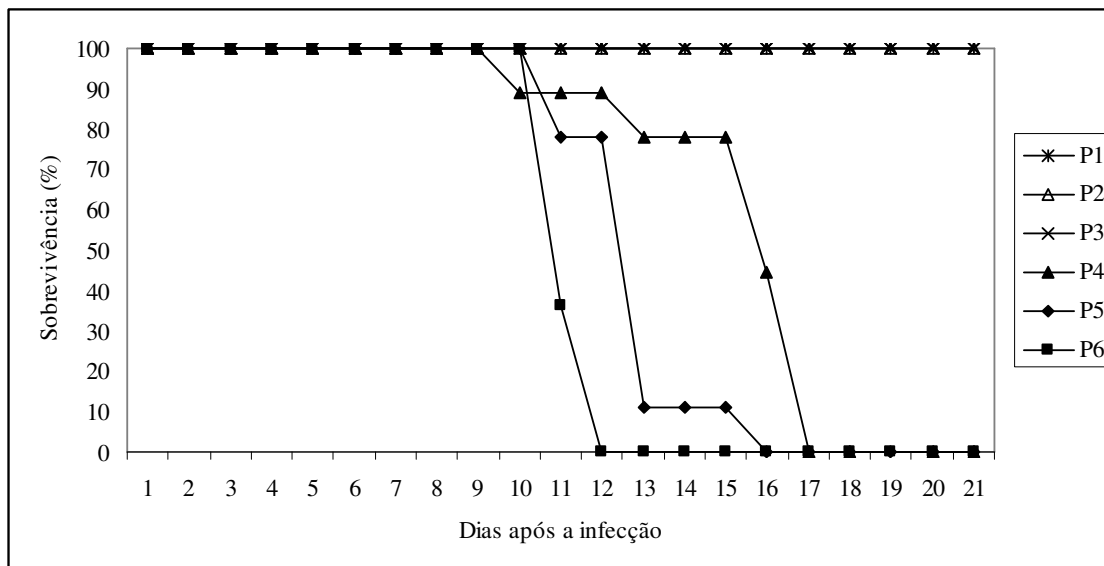


Fig. 4.8 - Sobrevivência de camundongos após inoculação i.c. com o isolado BR/01-MR durante o processo de neuroadaptação. Camundongos infectados foram observados por 21 dias e a mortalidade registrada. P: Passagem 1 a 6 em cérebro de camundongos.

Embora as passagens do vírus BR/01-MR tenham ocasionado, após a quarta passagem, severa encefalite em camundongos neonatos, não foi possível detectar através da técnica de FIA a presença de partículas virais infectivas em células da linhagem C6/36 infectadas com a suspensão 10% do tecido cerebral das passagens MR/NA-P1 a P6.

O RNA extraído, tanto com kit comercial *RNeasy mini Kit* (QIAGEN®) quanto com a técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, a partir do tecido cerebral dos camundongos infectados durante o processo de neuroadaptação do vírus BR/01-MR, foi submetido à diversas estratégias de amplificação por RT/PCR para a caracterização do genoma viral. Para tanto, utilizou-se diferentes oligonucleotídeos específicos para DENV-1 com o intuito de amplificar os genes que codificam para as proteínas E e NS3 dos vírus resultantes das passagens 1 e 2 e o genoma completo das passagens 3, 4, 5 e 6 do vírus BR/01-MR. No entanto, não se obteve nenhum amplicom do tamanho esperado e todas as demais tentativas de amplificação por RT/*Nested-PCR* para detectar a presença de RNA viral no tecido cerebral de camundongos infectados com o isolado viral BR/01-MR durante todas as passagens, também resultaram negativas.

Na tentativa de identificar a presença de RNA viral no tecido cerebral infectado com MR/NA P6 antes do aparecimento dos sinais de doença, uma cinética de infecção foi realizada em camundongos neonatos infectados com a variante MR/NA P6. O cérebro de dois camundongos foram coletados 2, 4, 6 e 8 dpi para extração de RNA presente no tecido cerebral dos camundongos infectados e análise por RT/*Nested*-PCR para detecção do RNA viral. Da mesma forma, não se evidenciou positividade por essa técnica em nenhum ponto da cinética de infecção (Fig. 4.9). Bandas fracas foram observadas no gel quando todo o volume da amostra foi aplicado (Fig. 4.9). No entanto, quando mais uma amplificação por *Nested*-PCR foi realizada, utilizando-se 10 μ L da reação do PCR 2, não se observou a presença de bandas no gel.

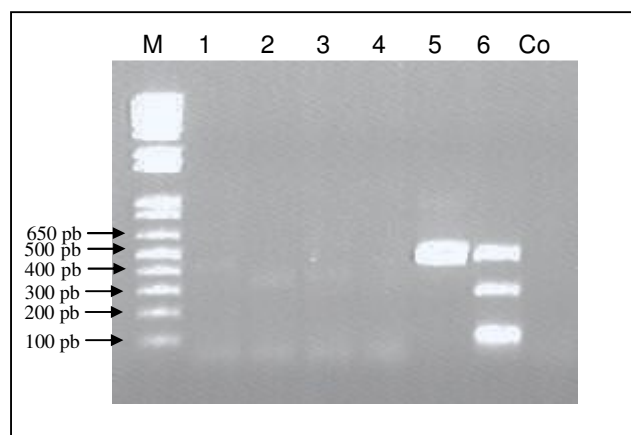


Fig. 4.9 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amplificação por *Nested*-PCR para diagnóstico de dengue da cinética de infecção em cérebro de camundongos da variante viral MR/NA P6. **M.** Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder. **1.** MR/NA P6 2 dpi, **2.** MR/NA P6 4 dpi, **3.** MR/NA P6 6 dpi, **4.** MR/NA P6 8 dpi, **5.** controle positivo de DENV-1 (FGA/NA P6 8dpi) **6.** controle de dengue (DENV-1, DENV-2 e DENV-3), **Co.** controle negativo (mock).

A fim de identificar e quantificar o RNA viral presente no tecido cerebral de camundongos infectados com a variante MR/NA P6 realizou-se a técnica de qRT/PCR. O RNA extraído do tecido cerebral de camundongos infectados com FGA/NA P6 foi utilizado como controle positivo da reação. No entanto, não foi possível detectar a presença de RNA viral no tecido cerebral de animais infectados

com a variante MR/NA P6 pela técnica, de alta sensibilidade, de qRT/PCR (Fig. 4.10).

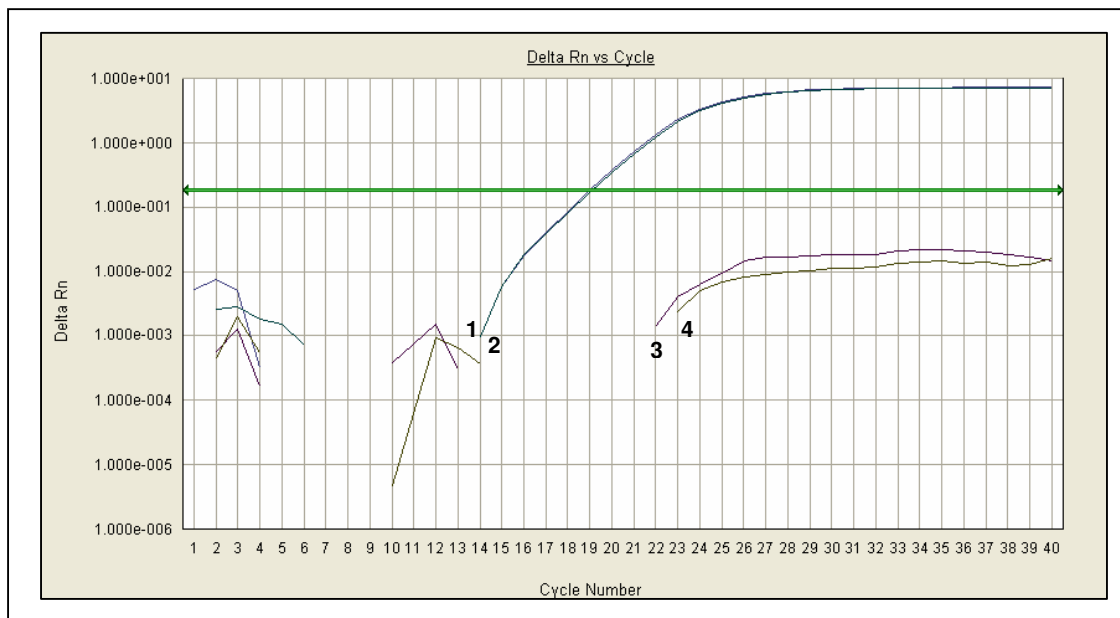


Fig. 4.10 – Amplificação por qRT/PCR das variantes neuroadaptadas FGA/NA P6 e MR/NA P6. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o ciclo da PCR. As linhas do gráfico mostram o resultado da amplificação em duplicata de FGA/NA P6 (1 e 2) e MR/NA-P6 (3 e 4).

Além do vírus da dengue, o gênero *Flavivirus* abrange algumas espécies de vírus que causam encefalite tais como: o vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV), o vírus da encefalite de St. Louis (SLEV) e o vírus do Oeste do Nilo (WNV).

Na tentativa de explicar o fenômeno de neurovirulência observado e avaliar a presença de outros flavivírus que poderiam estar envolvidos ou interferindo no processo de neuroadaptação do isolado viral BR/01-MR, o RNA presente no tecido cerebral de camundongos infectados com a variante MR/NA P6 foi extraído, precipitado pela técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e avaliado pela técnica de RT/*Nested*-PCR genérico para flavivírus. O RNA do vírus FGA/NA P5, extraído e precipitado pela técnica de fenol/clorofórmio/álcool, foi utilizado como controle da reação. No entanto, a reação foi negativa para a presença de RNA viral de flavivírus na amostra MR/NA P6, mas positiva para os controles de DENV-1. Todo o volume das amostras foi aplicado em gel de agarose 1,5% para melhor visualização dos resultados (Fig. 4.11).

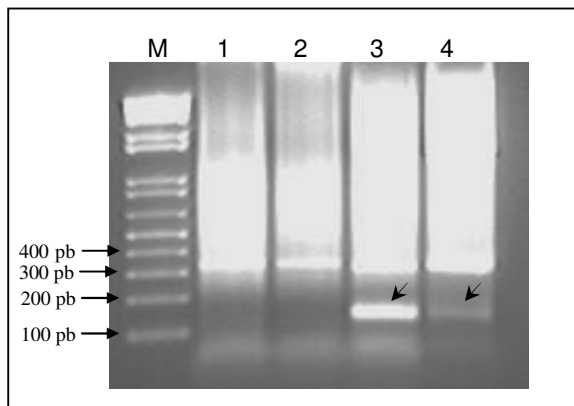


Fig. 4.11 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1% da amplificação por *Nested-PCR* para identificação de falavírus. **M.** Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder. **1.** MR/NA P6 8 dpi, **2.** MR/NA P6 8 dpi precipitado, **3.** FGA/NA P5 8 dpi precipitado, **4.** controle DENV-1.

Para se descartar uma eventual contaminação, o DNA extraído (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, conforme descrito no item 3.9.1) a partir do tecido cerebral de camundongos infectados com a variante MR/NA-P6, foi avaliado para a presença de vírus neurotrópicos, tais como, o grupo de vírus herpes simples (HSV) e o grupo de vírus varicella zoster (VZV), pela técnica de *Nested-PCR* específica para a identificação desses vírus. No entanto, não se detectou a presença de vírus herpes e nem varicella na passagem MR/NA P6, mas a reação de *Nested-PCR* foi positiva para os controles de HSV e VZV (Fig. 4.12).

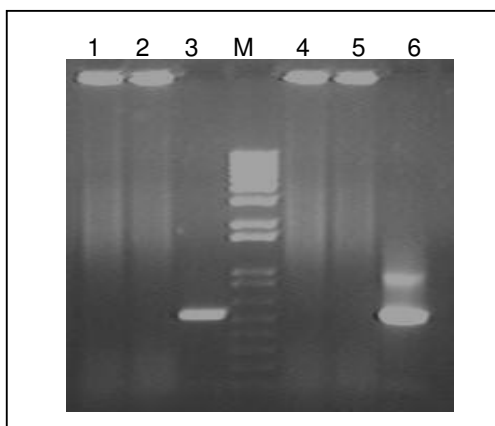


Fig. 4.12 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação por *nested PCR* para HSV e VZV. **M.** Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder. **1 e 4** MR/NA P6 8 dpi, **2 e 5** controle negativo, **3.** controle positivo de HSV, **4.** controle positivo de VZV.

A fim de isolar partículas virais presentes no tecido cerebral de camundongos durante o processo de neuroadaptação do isolado BR/01-MR, 600 μ L da suspensão 10% do tecido cerebral de MR/NA P1 foi utilizado para infectar cultura de células de mosquito AP-61. A infecção foi acompanhada por imunofluorescência indireta e revelada com anticorpos policlonais (DENV-1 Hawaii) (Fig. 4.13). Não foi observado efeito citopático e as células infectadas eram indistinguíveis do controle negativo da infecção. Após 10 dias de infecção os vírus presentes no sobrenadante de cultura foram recolhidos e titulados em células C6/36. O título viral presente no sobrenadante da infecção foi de $1,2 \times 10^2$ FFU/mL_{C6/36}. Embora o título viral de MR/NA P1 presente no sobrenadante das células AP-61 fosse baixo, 40 μ L do sobrenadante de cultura foram utilizados para inocular via i.c. um grupo de camundongos neonatos para avaliar a capacidade de infecção e replicação do vírus no SNC de camundongos. Após 8 dpi o cérebro de 3 animais foram recolhidos e o RNA presente no *pool* de tecido cerebral foi extraído e utilizado para amplificar por RT/PCR, os genes que codificam para as proteínas E e NS3 do DENV-1. No entanto, não se obteve PCRs positivas para DENV-1. O *pool* de tecido cerebral obtido foi utilizado também para a obtenção de uma suspensão 10% em PBS com 50 μ g/mL gentamicina, da qual 600 μ L foram utilizados para infectar células da linhagem AP-61, C6/36, Vero e Neuro2a. No entanto, não se observou a presença de células positivas 10 dpi para a infecção pelo DENV-1, através da técnica de IFI (Fig. 4.13).

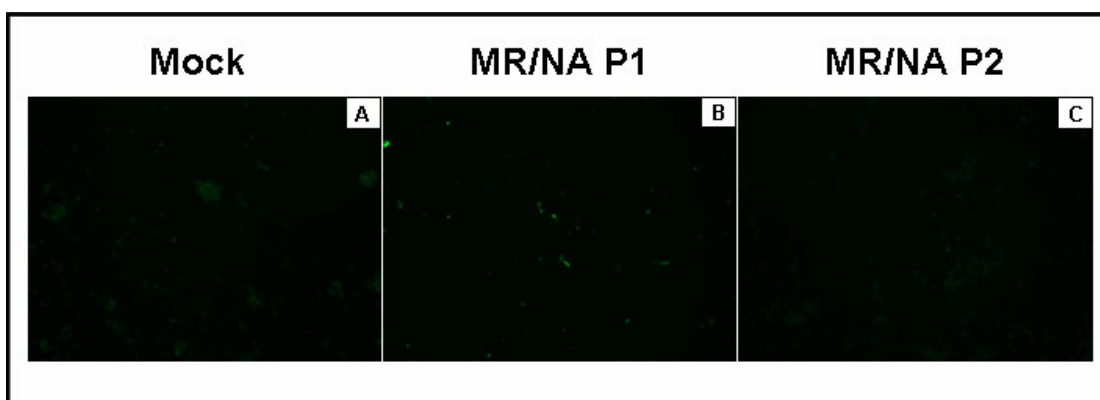


Fig. 4.13 Imunofluorescência indireta de células AP-61 infectadas com MR/NA P1 e MR/NA P2 10 dpi. As imunofluorescências foram reveladas com anticorpos policlonais (DENV-1 Hawaii) e anticorpo anti-camundongo secundário conjugado com FITC. Controle negativo da infecção em células AP-61 (A.). Infecção de MR/NA P1 em células AP-61 (B.). Infecção de MR/NA P2 em células AP-61, em AP-61. As imagens foram feitas em um NIKON ECLIPSE E600 (Nikon, Inc., Melville, NY) com Olympus BX 50 com Image-Pro® Plus software versão 4.5 (Maryland, USA) em aumento de 20x.

O RNA viral presente no sobrenadante da cultura celular infectada com MR/NA P1 foi extraído com o kit comercial Qiamp RNA (QIAGEN®) e utilizado para amplificar por RT/PCR e determinar a seqüência nucleotídica dos genes que codificam para as proteínas E e NS3 e a região 3' e 5' UTR do genoma viral (Fig. 4.14). No entanto, não foi possível amplificar a região final (10.455 – 10.735) do genoma de MR/NA P1 proveniente do sobrenadante de cultura celular. Nenhuma substituição foi identificada nas seqüências nucleotídicas dos genes correspondentes as proteínas E e NS3 e nas regiões 3' UTR e 5' UTR analisadas.

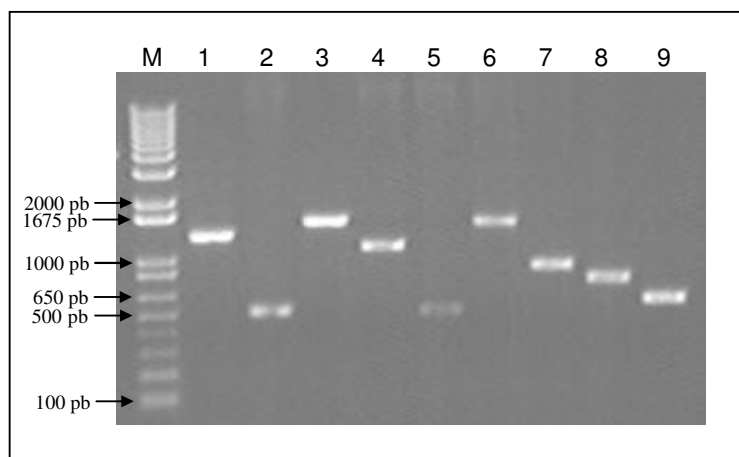


Fig. 4.14 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação independente dos genes que codificam para as proteínas E (1) e NS3 (2 e 3) e região 5' UTR e 3' UTR do vírus MR/NA P1 proveniente do sobrenadante de cultura em células AP-61. **M.** Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder. **1.** DENV-1 CN14 CN21 **2.** DENV-1 CS2 CN15 **3.** DENV-1 CN10 Hel 3' **4.** DENV-1 CN5 Domb **5.** DENV-1 PhD 20 CN12 **6.** DENV-1 M5' Domb **7.** DENV-1 5'SP6 prM3' **8.** DENV-1 NS3 28 Mer **9.** DENV-1 Domb Narxho.

Para tentar isolar partículas virais presentes na suspensão 10% do tecido cerebral de camundongos infectados com MR/NA P6, 600 μ L da suspensão foram utilizados para infectar células da linhagem Neuro2a. A infecção foi acompanhada por 10 dpi através de reações de IFI com anticorpos policlonais DENV-1 Hawaii, mas não se observou positividade para a infecção do vírus em células Neuro2a. O sobrenadante da cultura foi recolhido e o RNA intracelular foi extraído a partir do sedimento celular com o kit QIAgen Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®) e utilizado para

as reações de RT/*Nested*-PCR para diagnóstico de dengue. No entanto, não foi possível amplificar o fragmento de DNA específico para DENV-1 em células Neuro2a infectadas com a amostra MR/NA P6.

A fim de isolar a partícula viral e caracterizar a estrutura molecular do vírus foi realizada mais uma passagem da variante MR/NA em cérebro de camundongos neonatos a partir da suspensão 10% de MR/NA P6. Na sétima passagem de MR/NA, o fenótipo de neurovirulência apresentou-se de forma mais severa em camundongos neonatos, sendo que os primeiros sinais de doença foram evidenciados por volta de 5 dpi e nenhum animal sobreviveu mais do que 10 dpi. Mas da mesma forma, não foi possível detectar partículas virais utilizando-se a técnica de FIA e nem obter PCRs positivas para DENV-1. Como não foi possível amplificar o RNA viral da amostra MR/NA P7, o RNA extraído com o kit *RNeasy mini Kit* (QIAGEN®) a partir da amostra MR/NA-P7 foi concentrado em colunas Microcon® (YM-30) e dosado em uma diluição 1:10 em espectrofotômetro (260 nm). O RNA da amostra foi concentrado 7 vezes (2.469 ng/μL) a partir do volume inicial de RNA extraído com o kit comercial (350 ng/μL). Após a concentração, o RNA dosado foi submetido a ampliações por RT/PCR e qRT/PCR específicas para o gene que codifica para a proteína E de DENV-1. Mesmo após a concentração do RNA não foi possível amplificar o RNA viral por PCR e nem por qRT/PCR (Fig. 4.15).

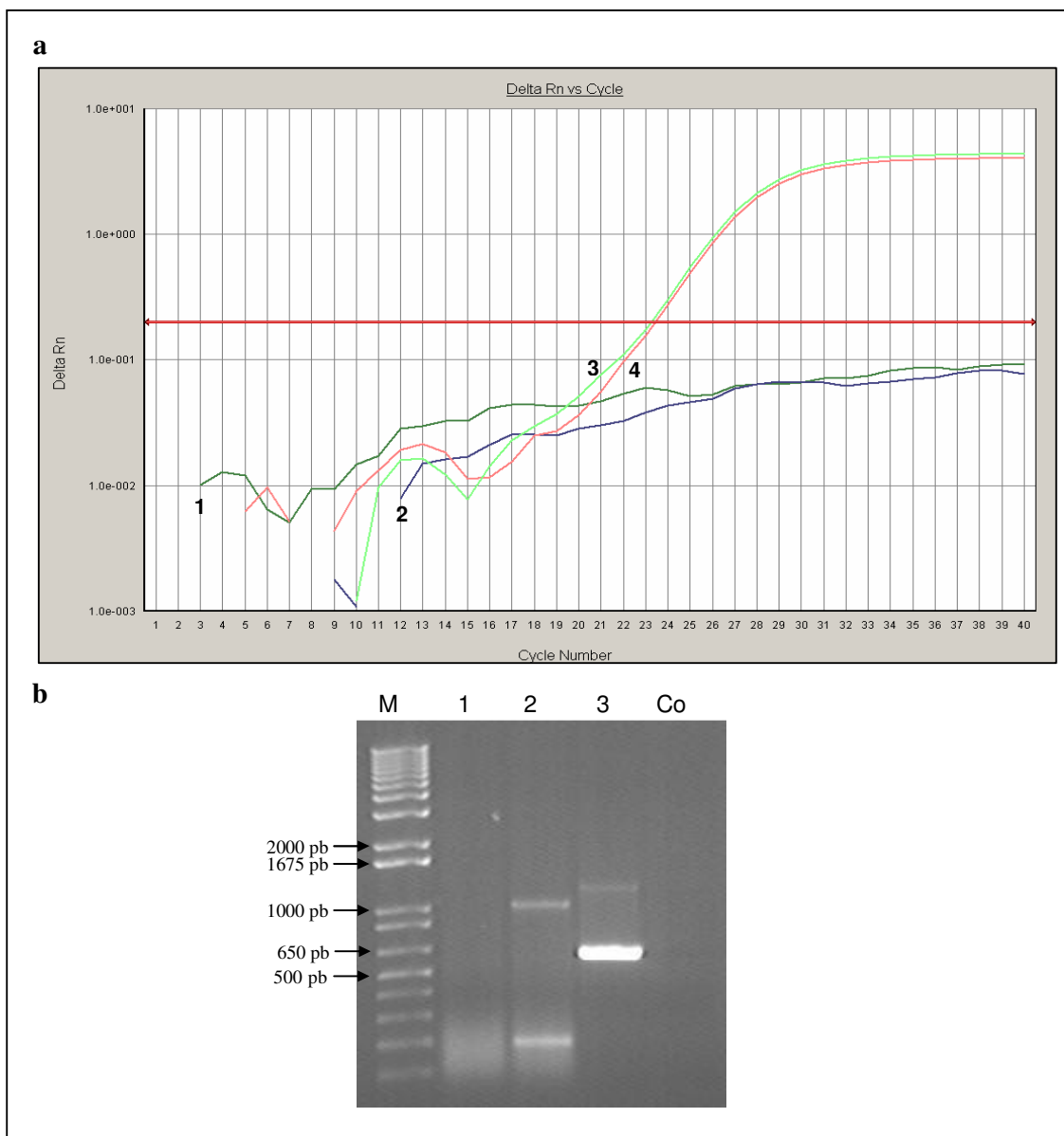


Fig. 4.15 – Amplificação por PCR e qRT/PCR da passagem neuroadaptada MR/NA P7. **A.** O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o ciclo da PCR. As linhas do gráfico mostram o resultado da amplificação em duplicata de MR/NA-P7 (1 e 2) e o vírus neuroadaptado a5c purificado em gradiente de sacarose (3 e 4), utilizado como controle positivo da reação. **B.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação do gene que codifica para a proteína E. **M.** Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder. **1.** MR/NA P7 DENV-1 Domb/NarXho, **2.** MRNA/P7 DENV-1 EcoNSi/PhD15, **3.** FGA/NA P6 DENV-1 Domb/Narxho (controle positivo). **Co.** controle negativo (mock).

4.3 Análise estrutural e ultra-estrutural dos vírus neuroadaptados

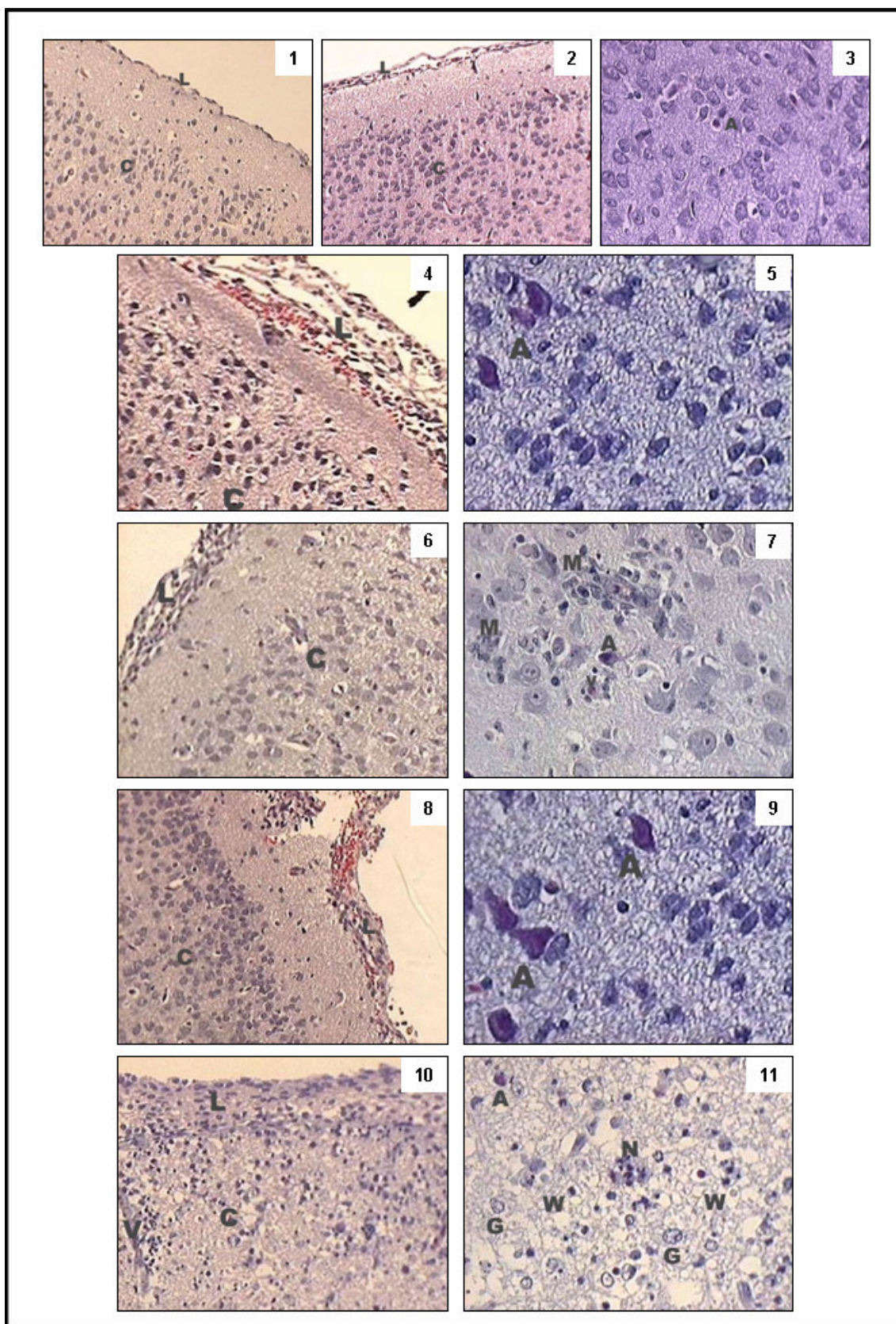
A fim de avaliar os danos no SNC de camundongos causados pela infecção dos vírus neuroadaptados, o tecido cerebral de camundongos infectados com o mock, com as variantes neuroadaptadas FGA/NA-P6 e MR/NA P7 e com as cepas parentais foram analisados através da técnica de histopatologia. Os animais selecionados para a análise foram sacrificados em estágio terminal de doença, quando apresentaram sinais severos de encefalite.

Os achados histológicos demonstram que as secções do cérebro dos animais infectados com o Mock 8 dpi e 10 dpi são indistinguíveis do cérebro dos animais não inoculados e não apresentaram qualquer alteração específica, tanto nas meninges quanto no córtex cerebral e substância branca. Ambos apresentam leptomeningite discreta, formada por apenas uma camada de células meningoteliais e o córtex neuronal apresentando sua estrutura preservada, com raras células neuronais mortas e sem processo inflamatório (Fig. 4.16). Essa análise evidencia que danos observados no tecido cerebral dos camundongos não são em decorrência de qualquer alteração presente no animal ou do procedimento de inoculação i.c.

As secções do cérebro dos camundongos infectados com os vírus parentais, FGA/89 e BR/01-MR, apresentaram moderada leptomeningite crônica linfocitária, mas o córtex neuronal manteve-se preservado sem a presença de processo inflamatório, similar ao controle negativo. O tecido cerebral dos animais infectados com o vírus FGA/NA P6 apresentam leptomeningite linfocítica crônica intensa e moderada encefalite, com necrose neuronal (neurônios vermelhos), micróglia em torno dos neurônios em processo de morte, satellitose dos linfócitos e presença de nódulos microglial e linfócitos perivasculares. As secções do cérebro dos camundongos infectados com a variante MR/NA P7 apresentaram leptomeningite crônica linfocitária acentuada e encefalite acentuada, com processo inflamatório crônico e agudo em córtex neuronal. As lesões tanto de córtex neuronal como em núcleos profundos no cérebro dos animais infectados com a amostra MR/NA P7 são representadas por necrose neuronal acentuada (neurônios vermelhos) principalmente cortical com satellitose de linfócitos e micróglia ao redor do neurônio em processo de morte, presença de nódulos microgliais e linfócitos perivasculares. Além disso, há exudação neutrofílica e linfocitária perivascular,

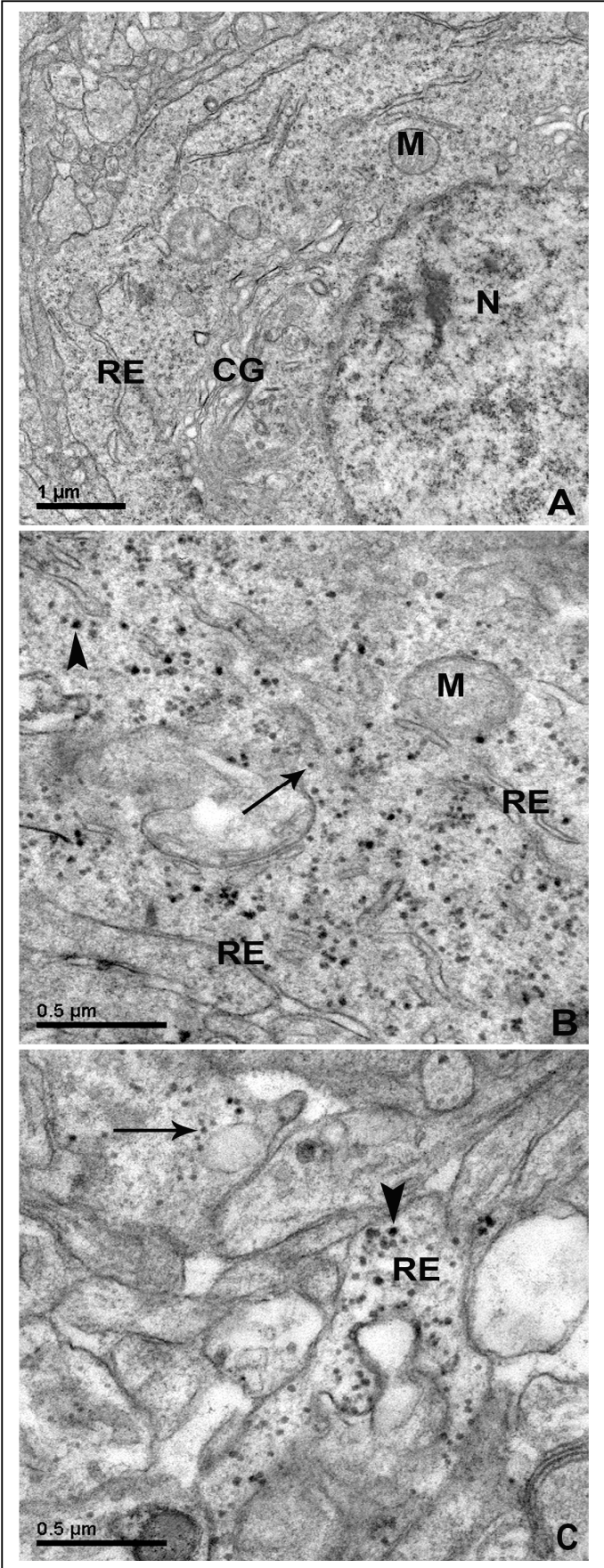
reação da glia astrocitária e necrose de substância branca (Fig. 4.16). Os achados histológicos demonstram a presença de uma reação inflamatória mais severa no SNC de camundongos neonatos infectados com a variante MR/NA P7 do que a infecção pelo vírus FGA/NA P6.

Fig. 4.16 - Histopatologia do SNC de camundongos infectados com mock, com os vírus DEN-1 FGA/89 e BR/01-MR e com as variantes neuroadaptadas FGA/NA P6 e MR/NA P7, corados com hematoxilina e eosina. **(1.)** Meninges de camundongos não inoculados com 10 dias de vida. **(2.)** Meninges e **(3.)** córtex neuronal (C) de camundongos infectados com PBS contendo 50µg/mL gentamicina (mock). **(4.)** Meninges e **(5.)** córtex neuronal de camundongos infectados com o vírus FGA/89 10 dpi, em que se observa moderada leptomeningite (L) crônica linfohistiocitária e córtex neuronal (C) sem processo inflamatório. **(6.)** Meninges e **(7.)** córtex neuronal de camundongos infectados com a variante FGA/NA P6 10 dpi, em que se observa leptomeningite (L) linfohistiocítica crônica intensa, córtex neuronal (C) com laminação mantida, presença de neurônios em apoptose (A) e nódulo microglial (M). **(8.)** Meninges e **(9.)** córtex neuronal de camundongos infectados com o vírus BR/01-MR 8 dpi, em que se observa moderada leptomeningite (L) crônica linfohistiocitária, presença de alguns neurônios em apoptose (A) e córtex neuronal (C) sem processo inflamatório. **(10.)** Meninges e **(11.)** córtex neuronal de camundongos infectados com a variante MR/NA P7 8dpi, em que se observa acentuada leptomeningite (L) crônica linfohistiocitária, córtex neuronal (C) com processo inflamatório crônico e agudo e exsudação neutrofílica), presença de neurônios em processo de morte (A), exsudação neutrofílica (N) e linfocitária perivascular (V), necrose de substância branca (W) e reação da glia astrocitária (G). HEx20 e HE x40.



Após avaliar os danos no SNC dos camundongos infectados com os vírus FGA/NA P6 e MR/NA P7, a presença de partículas virais no SNC dos camundongos infectados com essas variantes neuroadaptadas foi avaliada por MET. Métodos convencionais de fixação e emblocamento (glutaraldeído, tetróxido de ósmio e Epon 812) dos espécimes foram empregados. Alterações morfológicas e partículas virais não foram identificadas no tecido cerebral de camundongos infectados com o mock. No entanto, partículas virais de aproximadamente 30 e 50 nm de diâmetro foram identificadas no tecido cerebral dos camundongos infectados tanto com a variante FGA/NA P6 quanto com a variante MR/NA P7 (Fig. 4.17). Os flavivírus apresentam um nucleocapsídeo esférico de aproximadamente 25 a 30 nm de diâmetro, o qual é envolto por uma bicamada lipídica que compõe a partícula viral de 40 a 60 nm de diâmetro (RICE, 1996). As partículas esféricas observadas no SNC de camundongos infectados com as variantes neuroadaptadas condizem com o tamanho das partículas esféricas de DENV observadas em cultura de células de mosquito (BARTH, 1992) e em cultura de monócitos humano (MOSQUERA et al., 2005). As partículas virais foram encontradas mais freqüentemente nas cisternas do retículo endoplasmático (RE). Uma severa destruição tecidual foi observada nas secções do SNC de camundongos inoculados com a amostra MR/NA P7 (Fig.4.19).

Fig. 4.17 – Micrografia eletrônica das secções do SNC de camundongos infectados com mock, FGA/NA P6 e MR/NA P7 embebidos em resina PolyBed-812. **A.** Mock 10 dpi, partículas virais não foram detectadas nas secções dos camundongos inoculados com PBS contendo 50µg/mL gentamicina. **B.** FGA/NA P6 10 dpi, detecção de partículas do vírus da dengue nas secções dos camundongos inoculados com o vírus FGA/NA P6. **C.** MR/NA P7 7 dpi, detecção de partículas do vírus da dengue nas secções dos camundongos inoculados com a variante MR/NA P7. (M) mitocôndria, (CG) complexo de Golgi, (N) núcleo, (RE) Retículo endoplasmático, (seta) partícula densa mostrando o nucleocapsídeo-like, (cabeça de seta) nucleocapsídeo-like envolto por uma camada eletrodensa.



Para demonstrar a presença de proteínas virais no SNC de camundongos infectados tanto com as amostras FGA/NA P6 e MR/NA P7, uma análise por imunocitoquímica ultra-estrutural utilizando-se anticorpos monoclonais anti-E (4G2), grupo específico para vírus do gênero *Flavivirus*, e anti-NS1 (G18-1b), específico para os quatro sorotipos do vírus da dengue, foi realizada. Métodos convencionais de fixação e embocamento (glutaraldeído, paraformaldeído e Lowicril HM20) foram empregados. A especificidade da reação foi determinada pelo pré-tratamento das secções infectadas com a solução de bloqueio e pelo controle da reação, que se fez através da incubação das secções dos tecidos infectados apenas com anticorpos secundários anti-camundongo marcados com partículas de ouro de 10 nm. Dessa forma, não se observou ruído de fundo nas secções analisadas e o controle negativo da reação imunológica não apresentou marcação inespecífica (Fig. 18 e Fig. 19).

Os vírus da dengue foram detectados nas secções do SNC dos camundongos infectados com os vírus FGA/NA P6 (Fig. 18) e MR/NA P7 (Fig. 19), através da técnica de imunocitoquímica ultra-estrutural, utilizando anticorpos contra as proteínas E e NS1.

A microscopia das secções ultrafinas do SNC de camundongos infectados com os vírus neuroadaptados revelou uma distribuição difusa da proteína NS1 no tecido cerebral dos camundongos infectados. Em contraste com a distribuição agrupada da proteína E pelo tecido cerebral. A proteína E foi abundantemente encontrada nas secções do tecido cerebral de camundongos infectados com a variante MR/NA P7.

Fig. 4.18 – Detecção das proteínas E e NS1 de flavivírus por imunocitoquímica ultra-estrutural em secções ultrafinas do SNC de camundongos infectados com a variante FGA/NA P6 embebidos em Lowicril HM20. Secções ultrafinas foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-E (4G2), grupo específico para *Flavivirus*, e anti-NS1(G18-1b), específico para os vírus da dengue, e as proteínas foram detectadas com anticorpos secundários anti-camundongo marcados com partículas de ouro de 10 nm. **A.** Micrografia eletrônica das secções ultrafinas do SNC de camundongos infectados com a variante FGA/NA P6 tratadas apenas com anticorpos secundários anti-camundongo marcados com partículas de ouro de 10 nm, utilizadas como controle negativo. **B.** Micrografia eletrônica das secções ultrafinas do SNC dos camundongos infectados com a variante FGA/NA P6, mostrando a expressão da proteína E do vírus da dengue (seta). **C.** Micrografia eletrônica das secções ultrafinas do SNC dos camundongos infectados com a variante FGA/NA P6, mostrando a expressão da proteína NS1 do vírus da dengue (seta). (RE) retículo endoplasmático.

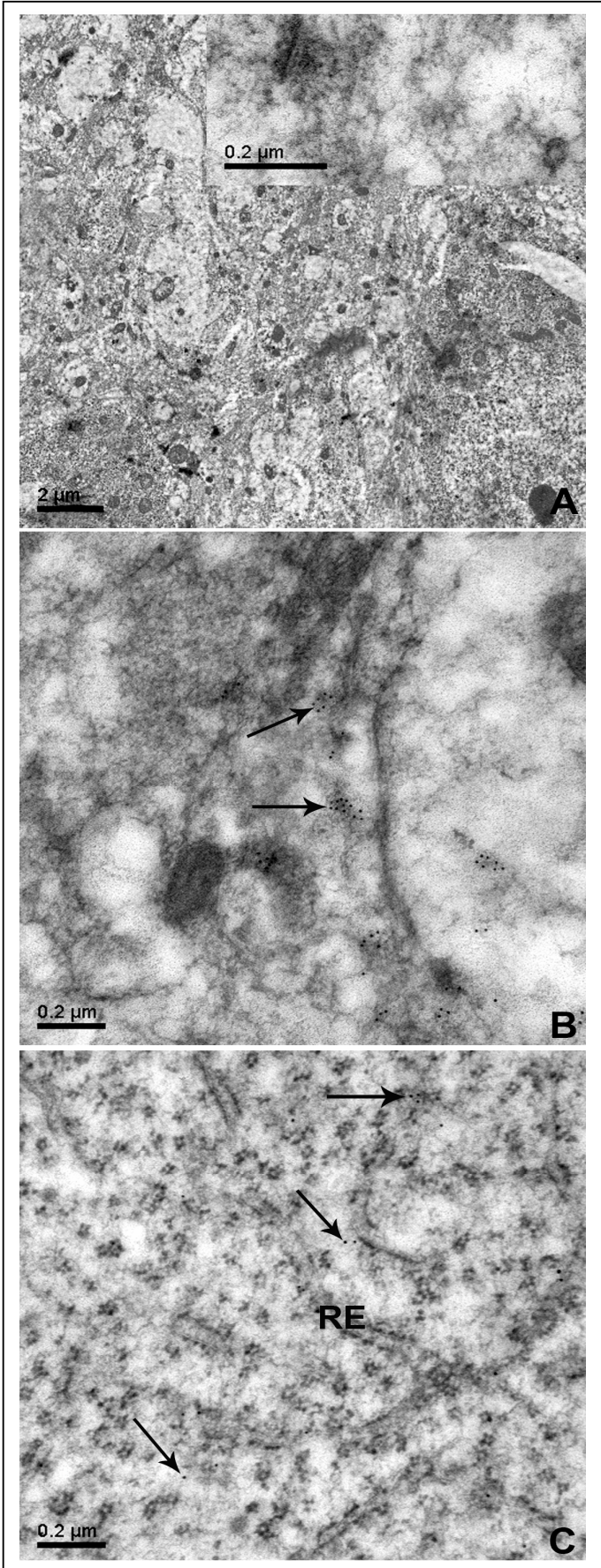
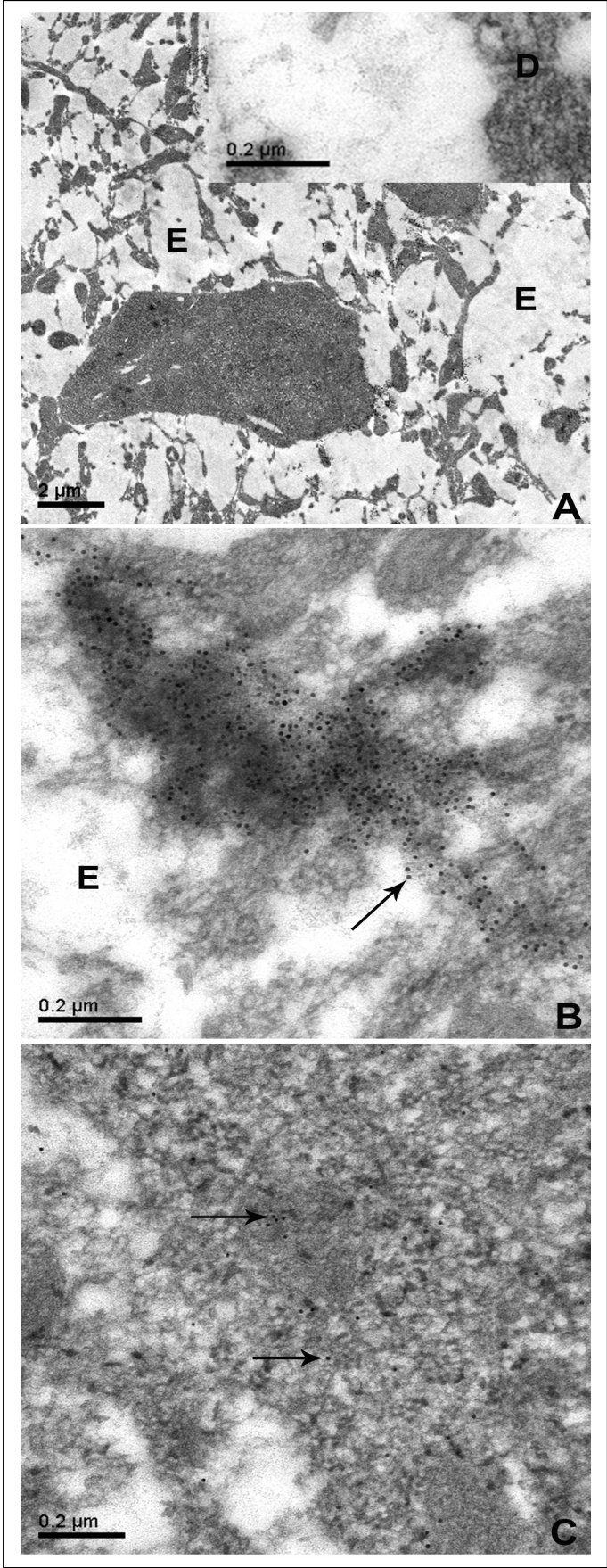


Fig. 4.19 – Detecção das proteínas E e NS1 de flavivírus por imunocitoquímica ultra-estrutural em secções ultrafinas do SNC de camundongos infectados com a variante MR/NA P7 embebidos em Lowicril HM20. Secções ultrafinas foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-E (4G2), grupo específico para *Flavivirus*, e anti-NS1 (G18-1b), específico para os vírus da dengue, e as proteínas detectadas com anticorpos secundários anti-camundongo marcados com partículas de ouro de 10 nm. **A.** Micrografia eletrônica das secções ultrafinas do SNC de camundongos infectados com a variante MR/NA P7 tratadas apenas com anticorpos secundários anti-camundongo marcados com partículas de ouro de 10 nm, utilizadas como controle negativo. **B.** Micrografia eletrônica das secções ultrafinas do SNC dos camundongos infectados com a variante MR/NA P7, mostrando a expressão da proteína E do vírus da dengue (seta). **C.** Micrografia eletrônica das secções ultrafinas do SNC dos camundongos infectados com a variante MR/NA P7, mostrando a expressão da proteína NS1 do vírus da dengue (seta). (E) edema.



5 DISCUSSÃO

Os vírus da dengue têm sido relacionados à episódios de encefalite desde 1969 (SARKAR et al., 1969) e durante os últimos anos, os casos clínicos de encefalite associados com o vírus do dengue têm aumentando significativamente (SUMARMO et al., 1978; LUM et al., 1996; RAMOS et al., 1998; SOLOMON et al., 2000; CAM et al., 2001 ; MIAGOSTOVICH et al., 2006).

Dois mecanismos principais estão envolvidos na patogênese neurológica durante a infecção pelo vírus da dengue: um ocasionado por danos sistêmicos indiretos, causando encefalopatia e o outro pela ação direta da replicação do vírus no tecido cerebral, causando encefalite (RAMOS et al., 1998). Nesse último, o vírus provavelmente atravessa a barreira hematoencefálica e infecta diretamente células do SNC, ocasionando os sinais de encefalite. Chaturvedi et al., (1991) utilizaram o modelo murino para demonstrar a habilidade do vírus da dengue em quebrar a barreira hematoencefálica, possivelmente pela liberação de um fator citotóxico (CF) produzido durante a infecção. O mecanismo pelo qual o vírus da dengue e outros vírus neurotrópicos atravessam a barreira hematoencefálica ainda não está totalmente compreendido, mas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) parece mediar mudanças na permeabilidade das células endoteliais que poderiam facilitar a entrada dos vírus no SNC (WANG et al, 2004).

Com o intuito de estudar a neuropatologia da dengue, Desprès et al., (1998), desenvolveram um modelo para selecionar variantes de DENV-1 altamente neurovirulentas, FGA/NA d1d e FGA/NA a5c, que se replicam eficientemente no SNC. Os determinantes genéticos potencialmente responsáveis pelo fenótipo neurovirulento dessas variantes mapeiam nas proteínas E e NS3 do vírus da dengue (DUARTE DOS SANTOS et al., 2000; BORDIGNON et al., 2007)). Para confirmar o envolvimento das mutações observadas nestas proteínas durante o processo de neuroadaptação de DENV-1 em camundongos e objetivando compreender melhor os mecanismos moleculares que pudessem estar envolvidos na neuropatogênese dos vírus da dengue nós reproduzimos a neuroadaptação do vírus FGA/89 e neuroadaptamos um isolado clínico recente (BR/01-MR).

No presente estudo, a passagem direta dos vírus FGA/89 e BR/01-MR em cérebro de camundongos neonatos resultou na aquisição de um fenótipo

neurovirulento a partir das passagens 3 e 4, respectivamente. Os sinais de comprometimento neurológico observados nos camundongos infectados com as cepas virais analisadas diferem, mas podem ser caracterizados principalmente por paralisia dos membros posteriores e/ou anteriores de envolvimento neurológico, seguida de morte. Após seis passagens em cérebro de camundongos, uma nova variante neuroadaptada do vírus FGA/89, FGA/NA P6, foi gerada.

Estudos demonstram que certas variantes neuroadaptadas de vírus dengue podem ter sua infectividade alterada em cultura de células de insetos (BHAMARAPRAVATI; YOKSAN, 1997; JIRAKANANAKIT et al., 1999), de primatas não humanos (HIRAMATSU et al., 1996; LEE; WEIR; DALGARNO, 1997) e de neuroblastoma murino (DUARTE DOS SANTOS et al., 2000). A infecção dos vírus FGA/89 e FGA/NA P6, em células de invertebrados (C6/36), símios (Vero) e neuroblastoma murino (Neuro2a) não revelou diferença significativa quanto à síntese de proteína E, analisadas por IFI. Os resultados obtidos por Duarte dos Santos et al., (2000) demonstram que o vírus FGA/89 e a variante neuroadaptada, FGA/NA d1d obtida por estes autores, infectam eficientemente células C6/36 e Vero, no entanto, diferem quanto a produção de proteínas virais e síntese de RNA em células Neuro2a, sugerindo que as mutações observadas nas posições NS3₄₃₅ e E₄₀₅ do genoma viral da variante FGA/NA d1d alteram o processo replicativo e montagem da partícula viral em células de neuroblastoma murino. Estudos complementares serão necessários para avaliar o envolvimento das mutações, identificadas em FGA/NA P6, na síntese de RNA e produção de progênie viral em diferentes linhagens celulares.

O seqüenciamento nucleotídico do genoma viral de FGA/89 durante o processo de neuroadaptação em modelo murino, detectou o surgimento de mutações nas proteínas E e NS3 durante a terceira passagem do vírus FGA/89 em cérebro de camundongos (FGA/NA P3), concomitante com o aparecimento dos sinais de encefalite. Somente três substituições de aminoácidos foram detectadas nos vírus neuroadaptados, FGA/NA P3-P6, E Phe₄₀₂/Leu, NS3 Val₂₀₉/Ile e NS3 Leu₄₈₀/Ser, quando comparados com a cepa parental FGA/89.

As substituições E Phe₄₀₂/Leu e NS3 Leu₄₈₀/Ser, embora não idênticas àquelas observadas em FGA/NA d1d (a outra variante neuroadaptada a partir da mesma cepa parental, FGA/89), mapeiam nos mesmos domínios das duas proteínas. A substituição Phe₄₀₂/Leu na proteína E se localiza na região α -hélice 1 anfipática (H1^{pred}) que precede a região transmembrana do domínio III da proteína (ALLISON

et al., 1999). A substituição Leu₄₈₀/Ser na proteína NS3 mapeia na região C-terminal do domínio II, entre o β -*harpin* 5' que sucede o motivo VI da superfamília 2 das helicases e a α -hélice 1 do domínio III. A mutação conservativa Val₂₀₉/Ile de FGA/NA P6 mapeia na α -hélice 1 do domínio I do domínio helicase da proteína NS3, entre o motivo I (Walker A), altamente conservado entre as superfamílias helicases 1 e 2, e o motivo Ia.

Mutações em determinadas regiões da proteína E podem influenciar na virulência dos flavivírus, tais como: (1) na face distal do domínio III (resíduos 303-395), região IgG-like. Mutações nessa região modificam a capacidade do vírus se ligar a célula hospedeira, afetando a internalização viral ou o tropismo celular; (2) na base do domínio II (resíduos 52-136 e 190-284), região que atua como dobradiça durante a mudança conformacional fusogênica da proteína; (3) na região de contato entre a interface dos domínios I e III. Essa região é o sítio de dimerização ou trimerização dos monômeros da proteína E após o contato do vírus com a membrana celular (REY et al, 1995; SÁNCHEZ; RUIZ, 1996; MODIS et al., 2004). A mutação observada no resíduo E₄₀₂ mapeia no domínio III da proteína E na região α -helicoidal E₄₀₀₋₄₁₂ da H1^{pred} (STIASNY et al., 1996). Este domínio é essencial para a conversão da proteína E solúvel na forma de dímero para homotrímero, induzidas por baixo pH, para que ocorra a interação do vírus com a membrana da célula alvo (STIASNY et al., 2005; MODIS et al., 2004). Baseado nessas premissas, a presença de mutações na região H1^{pred} do vírus da dengue poderia facilitar o processo de trimerização com conseqüente fusão de membranas e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma das células do SNC de camundongos. Dessa forma, uma maior síntese de RNA viral e produção de progênie viral poderiam ocorrer, afetando a virulência e aumentando a patogenicidade da infecção do vírus neuroadaptado em camundongos.

O alinhamento de seqüências na região do genoma correspondente a proteína E revelou que o resíduo de aminoácido Phe na posição E₄₀₂ é conservada no vírus da dengue tipo 1 e em outros flavivírus (STIASNY et al., 1996). Trabalhos anteriores demonstram o envolvimento de substituições de aminoácidos na região próxima à âncora hidrofóbica da proteína de E na aquisição de um fenótipo neurovirulento (KAWANO et al., 1993; LEE et al., 1997; DUARTE DOS SANTOS et al., 2000), evidenciando a susceptibilidade dessa região para mutações adaptativas durante passagens seriadas em cérebro de camundongos e, sugerindo

a importância da região H1^{pred} da proteína viral E na neuropatogênese da dengue em modelo murino.

Da mesma forma que a proteína E, a proteína NS3 parece ter um papel fundamental na aquisição do fenótipo viral de neurovirulência. Duarte dos Santos et al., (2000) demonstraram que a mutação NS3₄₃₅ no vírus FGA/NA d1d parece aumentar a habilidade de replicação do vírus em células Neuro2a. A substituição não conservativa da NS3 Leu₄₈₀/Ser detectada na variante FGA/NA P6 está situada no mesmo domínio II helicase da substituição NS3 Leu₄₃₅/Ser, presente em FGA/NA a5c e em FGA/NA d1d, sugerindo a participação dessa proteína no processo de neurovirulência em camundongos. O alinhamento de seqüências do domínio helicase da proteína NS3 evidencia a presença de um resíduo Ser na região correspondente à posição 480 dos vírus da encefalite japonesa (JEV) e febre amarela (YFV) (cepa vacinal 17D, neurovirulenta) (XU et al., 2005), sugerindo a importância desse resíduo na habilidade do vírus se replicar em células do SNC. A substituição NS3₄₈₀ está localizada na região *β-harpin* que emerge do motivo VI da superfamília II de RNA helicases (SAMPATH et al., 2006). O motivo VI das RNAs helicases está envolvido na ligação da proteína ao RNA, ligação/hidrólise de ATP e é requerido para a movimentação da helicase ao longo do substrato de ácidos nucleicos (TUTEJA; TUTEJA, 2004). Especula-se que a mutação não conservativa na posição NS3₄₈₀ do vírus FGA/89 neuroadaptado possa afetar a atividade da proteína NS3 helicase requerida nas funções replicativas do vírus e, dessa forma, aumentar a eficiência de replicação dos vírus no SNC murino.

A mutação conservativa Val₂₀₉/Ile de FGA/NA P6 está localizada entre os motivos Walker A e Walker B (motivos I e II, respectivamente) do domínio I helicase da proteína NS3, os quais tem características de ATPase (SINGLETON; WIGLEY, 2002). Baseado no alinhamento da seqüência de aminoácidos do domínio helicase da NS3, uma Ile na posição correspondente a posição 209 da proteína NS3 dos DENV-1 é observada nos vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus do Oeste do Nilo (WNV) e *Tick Borne Encephalitis virus* (TBEV) (XU et al., 2005), todos pertencentes ao grupo de vírus que causam encefalite. Esses achados suportam a idéia de que essas mutações identificadas nas variantes FGA/NA P3-P6 poderiam aumentar a habilidade de replicação do vírus no SNC de camundongos, já que os níveis mais elevados de replicação do RNA viral no SNC de camundongos foram observados nas passagens em que 100% dos animais morreram (passagens P3 e P6). As

mutações poderiam modular a eficiência do complexo de replicação (CR) para catalisar a síntese de novas moléculas de RNA em células do SNC de camundongos (DUARTE DOS SANTOS et al., 2000). Uma replicação mais eficiente do vírus neuroadaptado, com conseqüente produção de proteínas virais e progênie viral no SNC de camundongos poderia induzir uma resposta imune exacerbada e danos irreversíveis no SNC, ocasionando encefalites severas e morte do hospedeiro.

A determinação da seqüência nucleotídica do RNA viral de todas as passagens de FGA/89 em cérebro de camundongos revelou um consenso predominante, mas a análise cuidadosa dos eletroferogramas mostrou heterogeneidade de nucleotídeos na mesma posição do genoma, ao longo do processo de neuroadaptação. Esses resultados sugerem uma competição entre populações de RNA viral diferentes durante as passagens no SNC de camundongos. As taxas elevadas de erro da RNA polimerase (10^{-3} to 10^{-5} /nucleotídeo/ciclo) e a pressão seletiva elevada para a replicação do vírus da dengue em um meio diferente, como o SNC de camundongos neonatos, constituem provavelmente o principal mecanismo responsável pelo aparecimento de populações de vírus neuroadaptados (DOMINGO; HOLLAND, 1997; CROTTY et al., 2001). Vignuzzi et al., (2006) propõe que as quasispécies são essenciais para a adaptação e a sobrevivência dos vírus em ambientes com novas pressões seletivas, tais como o SNC de camundongos. No entanto, a existência de uma barreira para a disseminação viral dentro de um determinado tecido, fenômeno denominado de *bottleneck*, pode reduzir a complexidade de quasispécie e resultar na transição de um fenótipo viral (ESCARMÍS et al, 2008). O efeito *bottleneck* restringe o número de genomas, limitando a diversidade genética e possibilitando a seleção positiva de variantes que apresentam vantagens genéticas para se replicar em um ambiente com novas pressões seletivas, resultando na dominância de variantes melhores adaptadas (DOMINGO; HOLLAND, 1988; BIEBRICHER, 1999; PFEIFFER; KIRKEGAARD, 2006). As interações entre diferentes variantes e o fenômeno de *bottleneck* parecem ser uma explicação para a flutuação de mortalidade observada durante o processo de neuroadaptação de FGA/89.

O vírus BR/01-MR, diferentemente do vírus FGA/89, que apresenta um longo histórico de passagens em cultura de células, é um isolado recente de um paciente com FD, com histórico de passagens conhecido e limitado. Com o objetivo de confirmar o envolvimento das mutações observadas nas proteínas E e NS3 de

FGA/NA-P6, FGA/NA-d1d e a5c, decidimos neuroadaptar o isolado BR/01-MR utilizando a mesma metodologia usada para obter o vírus FGA/NA-P6.

No entanto, não foi possível identificar a presença de RNA viral pelas técnicas de RT/PCR e qRT/PCR em cada uma das passagens do vírus BR/01-MR em cérebro de camundongos. Bordignon et al., (2007) demonstraram em uma cinética de infecção que o vírus BR/01-MR não se replica eficientemente no SNC de camundongos neonatos, não sendo possível detectar RNA viral nem estabelecer título viral no tecido cerebral de camundongos infectados, nos diversos pontos da cinética de infecção testados.

A presença de partículas virais e RNA viral foi detectada apenas após a infecção do vírus MR/NA P1 em células AP-61. O título viral foi baixo e nenhuma substituição foi identificada nas seqüências nucleotídicas dos genes correspondentes as proteínas E e NS3 e nas regiões 3' UTR e 5' UTR analisadas. No entanto, não foi possível amplificar a porção final de aproximadamente 300 nucleotídeos do genoma viral. Estudos demonstram que deleções em determinados domínios da região 3' UTR podem diminuir significativamente ou mesmo abolir completamente a síntese de RNA viral sem afetar a tradução de proteínas virais (ALVAREZ et al., 2005; FILOMATORI et al., 2006). Por outro lado, partículas defectivas de interferência - partículas virais subgenômicas geradas a partir de passagens seriadas de um vírus *in vivo* ou *in vitro* - poderiam desempenhar um papel de RNAs defectivos que interferem com a replicação viral e, assim, contribuir para a modificação na patogênese viral (CAVE; HENDRICKSON; HUANG, 1985; SHELLAM; SANGSTER; UROSEVIC, 1998; TSAI et al., 2007).

Embora não tenha sido possível amplificar o RNA viral a partir das amostras de cérebro de camundongos infectados ao longo do processo de neuroadaptação de BR/01-MR, a análise ultra-estrutural das secções ultrafinas do SNC de camundongos infectados com as amostras FGA/NA P6 e MR/NA P7 demonstrou a presença de partículas elétron-densas correspondentes ao nucleocapsídeo (30 nm) e a partícula viral (50 nm) de flavivírus nas cisternas do RE, sugerindo replicação viral. Para confirmar a identidade das partículas virais observados por microscopia, utilizamos anticorpos monoclonais dirigidos contra as proteínas E de flavivírus e NS1 dos vírus da dengue em ensaios de imunolocalização. A análise por imunocitoquímica ultra-estrutural demonstrou a presença de proteínas E e NS1 no tecido cerebral dos camundongos infectados tanto com a variantes FGA/NA P6

quanto com MR/NA P7. A distribuição difusa da proteína NS1 no tecido cerebral dos camundongos infectados com as variantes FGA/NA P6 e MR/NA P7 próxima ao RE, sugere síntese da proteína (LINDENBACK; RICE, 2001). Uma grande concentração da proteína E foi identificada nas secções do tecido infectado com a variante MR/NA P7 em comparação com a quantidade de proteína E identificada nas secções do tecido cerebral infectado com FGA/NA P6. Especula-se que a extensiva produção da proteína E presente no SNC de camundongos infectados com MR/NA P7 poderia ser responsável pelos importantes danos observados no SNC dos camundongos. A presença eventual de deleções na região 3' UTR poderia ser uma explicação para a não detecção de RNA viral durante as passagens de BR/01-MR em cérebro de camundongos sem afetar a produção de proteínas e a formação de partícula viral no SNC de camundongos, conforme observado pela técnica de imunocitoquímica ultra-estrutural (ALVAREZ et al., 2005; FILOMATORI et al., 2006; HOLDEN et al., 2006). Por outro lado a presença de RNAs subgenômicos poderia interferir na replicação viral e regular a tradução de antígenos estruturais em excesso (QUADRI ; NEGRO, 2001). Desprès et al., (1996) sugerem que o acúmulo de proteínas virais no RE poderia induzir morte celular por apoptose pela ativação da via de sinalização por cálcio e interferir na montagem ou liberação da partícula viral no RE. Massiva replicação e produção de progênie viral poderiam também desencadear apoptose em células neuronais, ocasionando encefalite e morte (DESPRÈS et al., 1998; JELACHICH et al., 1996).

O mecanismo da produção de encefalites virais pode ser observado em decorrência de lesões mediadas tanto pela replicação viral quanto pela resposta imunológica do hospedeiro. A resposta imune frente a infecções por flavivírus pode provocar sérios prejuízos ao hospedeiro (KREIL; EIBL 1996; MORI et al., 1997). Membros da família *Flaviviridae* têm sido associados com indução de morte neuronal por apoptose *in vitro*, incluindo a infecção pelos vírus da dengue em células Neuro2a (DESPRÈS et al. 1996; DUARTE DOS SANTOS et al., 2000) e dos vírus da encefalite japonesa em células progenitoras neuronais de humanos (LIAO et al. 1997) e *in vivo* pela variante neuroadaptada do vírus da dengue, FGA/NA d1d (DESPRÈS et al., 1998). A morte neuronal por necrose *in vivo* também tem sido associada com encefalites pela infecção com membros da família *Flaviviridae*, incluindo os vírus da encefalite de St. Louis (SLEV) (MURPHY et al., 1968), os vírus

da encefalite japonesa (JEV) (ESIRI, 1997) e os vírus do Oeste do Nilo (CAMENGA et al. 1974).

Os dados histológicos observados neste estudo evidenciam a presença de um infiltrado de células inflamatórias e ativação da micróglia no SNC de camundongos infectados com as variantes neuroadaptadas FGA/NA P6 e MR/NA P7. A presença de edema tissular, ativação da micróglia e processo inflamatório crônico e agudo no SNC de camundongos infectados com a variante neuroadaptada MR/NA P7 sugere que o processo de morte celular por necrose seja o mecanismo mais provável para o desenvolvimento de encefalite fatal em camundongos neonatos durante o processo de neuroadaptação do isolado BR/01-MR. A alta taxa de produção de proteína E presente no SNC de camundongos infectados com a variante MR/NA P7 poderia ocasionar uma exacerbação da resposta imunológica. Estudos demonstram que a ativação microglial e a subsequente liberação de vários mediadores pró-inflamatórios induzem morte neuronal em camundongos infectados com o vírus da encefalite japonesa (SAXENA et al., 2008; GHOSHAL et al., 2007). A presença de alguns neurônios apoptóticos no córtex cerebral foi observada em todas as amostras analisadas (mock, FGA/89, FGA/NA P6, BR/01-MR e MR/NA P7) e é possível que a apoptose, nesse caso, tenha sido ocasionada por um fenômeno fisiológico associado à imaturidade cerebral (MENSAH, 1982; LOSSI; GAMBINO, 2008). Dessa forma, o envolvimento de apoptose e necrose na neuropatologia ocasionada pelos vírus da dengue e o envolvimento direto das mutações observadas nas proteínas E e NS3 da variante neuroadaptada de FGA/89 na aquisição de um fenótipo neurovirulento, necessita ser determinado de forma mais direta.

A habilidade dos vírus neuroadaptados em infectar e se replicar em células do SNC pode determinar sua virulência e causar danos irreversíveis nestas células. Nossos dados sugerem que as variantes neuroadaptados apresentam capacidade de infectar as células do SNC e ocasionar danos extensivos como leptomeningite e encefalite.

Solomon et al., (2000) demonstraram que a encefalite é uma manifestação neurológica freqüente nos pacientes durante a infecção do vírus da dengue. E considerando que os casos de infecção pelo vírus da dengue associados a complicações neurológicas vêm se tornando cada vez mais freqüentes, este modelo murino pode ser uma alternativa para se estudar a morfogênese viral e a

patogênese, decorrente da infecção pelos vírus da dengue no sistema nervoso central. Além disso, a identificação de assinaturas moleculares nas cepas de vírus dengue associadas à doença neurológica poderia ser utilizada para prever a emergência de epidemias (BRAULT et al., 2004) e dirigir eventualmente intervenções terapêuticas.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com o intuito de estudarmos diferentes aspectos da patogênese causada pela infecção dos DENV, escolhemos o modelo murino para a geração e caracterização molecular e biológica de variantes virais de DENV-1 neurovirulentas. A caracterização genética destes vírus permitiu determinar e confirmar o envolvimento de substituições de aminoácidos nas proteínas E e NS3 durante o processo de neuroadaptação e na aquisição do fenótipo de neurovirulência em camundongos neonatos.

As mutações na região H1^{pred} da proteína de envelope e no domínio helicase da proteína NS3 da variante neuroadaptada (FGA/NAP3-P6) aumentaram a habilidade deste vírus se replicar no SNC de camundongos, causando extensivos danos como leptomeningite e encefalite.

A outra variante neuroadaptada a partir de um isolado clínico recente, BR/01-MR, apresenta habilidades de infectar células do SNC de camundongos, produzir partículas virais e sintetizar tanto a proteína NS1 como grandes quantidades da proteína E em células do SNC, causando leptomeningite, encefalite e extensiva necrose de substância branca. No entanto, apesar dos resultados das análises histológicas e de microscopia eletrônica demonstrarem a presença de partículas e proteínas virais em células e tecidos infectados, não foi possível, através das técnicas empregadas, detectar RNA viral ou partículas virais infecciosas a partir de preparações de tecidos do SNC murino infectado. Como perspectiva em curto prazo, estamos realizando experimentos de neutralização *in vivo* a fim de se verificar de forma mais direta a infecção pela variante MR/NA P7 no SNC dos animais e, além disso, as amostras serão testadas em um *bio-chip* contendo sondas moleculares (70 *mer*) correspondentes a todos os genomas virais depositados nos bancos de dados (colaboração com o Dr. David Wang, Departamento de Microbiologia Molecular e Imunologia e Patologia Washington University School of Medicine). Alternativamente, experimentos de hibridização de RNA *in situ* serão realizados a fim de se avaliar a presença de RNA viral no tecido cerebral de camundongos infectados.

Para validar o envolvimento das mutações identificadas nas proteínas E e NS3 na neuropatogênese da dengue e excluir a possibilidade de um fenômeno específico do vírus FGA/89, um outro vírus bem caracterizado, DEN-1 BR/90, está

sendo neuroadaptado em modelo murino. As mutações detectadas no genoma nas variantes neurovirulentas serão ensaiadas utilizando-se o clone infeccioso de BR/90, recentemente desenvolvido em nosso laboratório (SUZUKI et al., 2007).

A identificação de marcadores moleculares e de mecanismos que induzem injúria ou morte celular em tecidos vitais, como o SNC, poderia contribuir para o entendimento da neuropatogênese da dengue e eventualmente permitir o delineamento de medidas direcionadas de intervenções terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ALCON-LEPODER, S.; DROUET, M.T.; ROUX, P.; FRENKIEL, M.P.; ARBORIO M.; DURAND-SCHNEIDER, A.M.; MAURICE, M.; LE BLANC, I.; GRUENBERG J.; FLAMAND M. The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: Implications for viral infectivity. **J. Virol.**, v. 79, n. 17, p. 11.403-11, 2005.
- ALLISON, S.L.; STIASNY, K.; STADLER, K.; MANDL, C.W.; HEINZ, F.X. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. **J. Virol.**, v. 73, n. 7, p. 5.605-12, 1999.
- ALVAREZ, D.E.; LODEIRO, M.F.; LUDUEÑA, S.J.; PIETRASANTA, L.I.; GAMARNIK, A.V. Long-range RNA–RNA interactions circularize the dengue virus genome. **J. Virol.**, v. 79, p. 6.631–43, 2005.
- ALVAREZ, D.E.; LODEIRO, M.F.; FILOMATORI, C.V.; FUCITO, S. MONDOTTE, J.A.; GAMARNIK, A.V. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. **Novartis Found Symp.**, v. 277, p. 120-32, 2006.
- ARIAS, C.F.; PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, JH. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. **Virology**, v. 193, n.2, p. 888-99, 1993.
- ASHBURN, P.M.; GRAIG, C.F. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. **J. Infect. Dis.**, v. 4, p. 440-75, 1907.
- AVIRUTNAN, P.; PUNYADEE, N.; NOISAKRAN, S.; KOMOLTRI, C.; THIEMMECA, S.; AUETHAVORNANAN, K.; JAIRUNGSRI, A.; KANLAYA, R.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; PUTTIKHUNT, C.; PATTANAKITSAKUL, S.N.; YENCHITSOMANUS, P.T.; MONGKOLSAPAYA, J.; KASINRERK, W. SITTISOMBUT, N.; HUSMANN, M.; BLETTNER, M.; VASANAWATHANA, S.; BHAKDI, S.; MALASIT, P. Vascular leakage in severe dengue virus infections: A potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **J. Infect. Dis.**, v. 193, n.8, p. 1.078-88, 2006.
- AVIRUTNAN, P.; ZHANG, L.; PUNYADEE, N.; MANUYAKORN, A.; PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; MALASIT, P.; ATKINSON, J.P.; DIAMOND, M.S. Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. **PLoS Pathog.**, v. 3, n. 11, p. 1.798-812, 2007.
- BARTH, O.M. Replication of dengue viruses in mosquito cell cultures. A model from ultrastructural observation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 565-74, 1992.
- BERA, A.K.; KUHN, R.J.; SMITH, J.L. Functional characterization of cis and trans activity of the Flavivirus NS2B-NS3 protease. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 17, p. 12.883-92, 2007.

- BHAMARAPRAVATI, N.; YOKSAN, T. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *In: Dengue and dengue hemorrhagic fever*, eds. GUBLER, D.J.; RUNO, G. **CAB International, New York**, p. 367-78, 1997.
- BHOOPAT, L.; BHAMARAPRAVATI, N.; ATTASIRI, C.; YOKSARN, S.; CHAIWUN, B.; KHUNAMORNPOONG, S.; SIRISANTHANA, V. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. **Asian Pac. J. All Immunol.**, v.14, p. 107-13, 1996.
- BIEBRICHER, C. K. *In Origin and Evolution of Viruses*, eds. DOMINGO, E., WEBSTER, R. K.; HOLLAND, J. J. **Academic, San Diego**, p. 65–85, 1999.
- BIELEFELDT-OHMANN, H. Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes. **Virus Res.**, v. 57, n.1, p. 63-79, 1998.
- BOOKS, A. J.; JOHANSSON, M.; CRISWELL, E; JANS, D. A; VASUDEVAN, S. G. The interdomain region of dengue NS5 protein interacts with NS3 and host proteins. **Dengue Bulletin**, v. 26, p. 155-161, 2002.
- BORDIGNON, J.; STROTTMANN, D.M.; MOSIMANN, A.L.; PROBST, C.M.; STELLA, V.; NORONHA, L.; ZANATA, S.M.; DOS SANTOS, C.N. Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. **J. Med. Virol.**, v. 79, n. 10, p. 1.506-17, 2007.
- BRAULT, A.C.; POWERS, A.M.; ORTIZ, D.; ESTRADA-FRANCO, J.G.; NAVARRO-LOPEZ, R.; WEAVER, S.C. Venezuelan equine encephalitis emergence: enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.101, n.31, p. 11.344-49, 2004.
- BRINTON, M.A.; FERNANDEZ, A.V.; DISPOTO, J.H. The 3' nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. **Virology**, v. 153, p. 113–21, 1986.
- CAHOUR, A., PLETNEV, A., VAZIELLE-FALCOZ, M., ROSEN, L., AND LAI, C.J. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. **Virology**, v. 207, p. 68–76, 1995.
- CALISHER, C.H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J. M.; SHOPE, R. E.; PORTERFIELD, J. S.; WESTAWAY, E.G.; BRANDT, W.E. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **J. Gen. Virol.**, v. 70, p. 37-43, 1989.
- CAM, V.B.; FONSMARK, L.; HUE, B.N.; PHUONG, T.N.; POULSEN, A.; HEEGAARD, D.E. Prospective case–control study of encephalopathy in children with dengue hemaorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 848–51, 2001.

- CAMENGA, D.L.; NATHANSON, N.; COLE, G.A. Cyclophosphamide-potentiated West Nile viral encephalitis-Relative influence of cellular and humoral factors. **J. Infect. Dis.**, v. 130, p. 634-41, 1974.
- CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: A case of mistaken identity? **J. Hist. Med. Allied. Sci.**, v. 26, p. 243-62, 1971.
- CAVE, D.R.; HENDRICKSON, F.M.; HUANG, A.S. Defective Interfering Virus Particles Modulate Virulence. **J. Virol.**, v.55, n. 2, p. 366-73, 1985
- CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R. & RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev. Microbiol.**, v. 44, p. 649-88, 1990.
- CHATURVEDI, U.C.; DHAWAN, R.; KHANNA, M.; MATHUR, A. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. **J. Gen. Virol.**, v.72, p.859-66, 1991.
- CHIU, W.W.; KINNEY, R.M.; DREHER, T.W. Control of translation by 5' and 3' terminal regions of the dengue virus genome. **J. Virol.**, v. 79, n. 13, p. 8.303-15, 2005.
- CHOTMONGKOL, V.; SAWANYAWISUTH, K. Case report: Dengue hemorrhagic fever with encephalopathy in an adult. **Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health.**, v. 35, p. 160-61, 2004.
- CHU, J.J.; NG, M.L. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. **J. Virol.**, v. 78, n. 19, p. 10.543-55, 2004.
- COLE, A.C.; WISSEMAN, C.L.Jr. Pathogenesis of type 1 dengue virus infection in suckling, weaning and adult mice: the relation of virus replication to interferon production and antibody formation. **Am. J. Epid.**, v. 89, n.6, p. 669-80, 1969.
- CROTTY, S.; CAMERON, C.E.; ANDINO, R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 98, n. 12, p. 6.895-900, 2001.
- CUI, T.; SUGRUE, R. J.; XU, Q.; LEE, A. K.; CHAN, Y. C. & FU, J. Recombinant NS3 dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. **Virology**, v. 246, p. 409-17, 1998.
- DELANO, W.L.; BROMBERG, S. The PyMOL user's manual. San Carlos, CA: **DeLano Scientific.**, 2004.
- DESPRÈS, P.; FRENKIEL, M.P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, v. 196, n.1, p.209-19, 1993.

- DESPRÈS, P.; FLAMAND, M.; CECCALDI, P.E.; DEUBEL, V. Human isolates of dengue virus type-1 induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. **J. Virol.** v. 70, p. 4.090–96, 1996.
- DESPRÈS, P., FRENKIEL, M.P., CECCALDI, P.E., DUARTE DOS SANTOS, C., DEUBEL, V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. **J. Virol.**, v. 72, n.1, p. 823-29, 1998.
- DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 51 p. 151-78, 1997.
- DOMINGUES, R.B.; KUSTER, G.W.; ONUKI-CASTRO, F.L.; SOUZA, V.A.; LEVI, J.E.; PANNUTI, C.S. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **J. Neurol. Sci.**, v. 267, p. 36-40, 2007.
- DUARTE DOS SANTOS, C.N.; ROCHA, C.F.; CORDEIRO, M.; FRAGOSO, S.P.; REY, F.; DEUBEL, V.; DESPRES, P. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. **Virus Res.**, v. 90, n. 1-2, p. 197-205, 2002.
- DREHER, T.W. Functions of the 3' untranslated regions of positive strand RNA viral genomes. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 37, p. 151–74, 1999.
- DUARTE DOS SANTOS, C.N., FRENKIEL, M.P., COURAGEOT, M.P., ROCHA, C.F., VAZEILLE-FALCOZ, M.C., WIEN, M.W., REY, F.A., DEUBEL, V., DESPRÈS, P. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virol.**, v. 274, n.2, p.292-308, 2000.
- ECKELS, K.H.; BRANDT, W.E.; HARRISON, V.R.; McCOWN, J.M.; RUSSELL, P.K. Isolation of a temperature-sensitive dengue-2 virus under conditions suitable for vaccine development. **Infect. Immun.**, v. 14, p. 1.221- 27, 1976.
- ESCARMÍ, C.; LÁZARO, E.; ARIAS, A; DOMINGO, E. Repeated bottleneck transfers can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: Implications for viral extinction. **J. Mol. Biol.**, v. 376, n. 2, p., 367-79, 2008.
- ESIRI, M.M.; READING, M.C.; SQUIER, M.V.; HUGHES, J.T. Immunocytochemical characterization of the macrophage and lymphocyte infiltrate in the brain in six cases of human encephalitis of varied aetiology. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** v. 15, n. 4, p. 289-305, 1989.
- FILOMATORI, C.V.; LODEIRO, M.F. ; ALVAREZ, D.E.; SAMSA, M.M.; PIETRASANTA, L.; GAMARNIK, A.V. A 5- RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. **Genes & Dev.** v. 20, p. 2.238-49, 2006.

- FLAMAND, M.; MEGRET, F.; MATHIEU, M.; LEPAULT, J.; REY, F. A.; DEUBEL, V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **J. Virol.**, v. 73, n. 7, p. 6.104-10, 1999.
- FONSECA, B.A.; PINCUS, S.; SHOPE, R.E.; PAOLETTI, E.; MASON, P.W. Recombinant vaccinia viruses coexpressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, v.12, p. 279-85, 1994.
- FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). Guia de Vigilância Epidemiológica. **FUNASA**, 2003.
- FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). Guia de Vigilância Epidemiológica. **FUNASA**, 2005.
- GERMI, R.; CRANCE, J.M.; GARIN, D.; GUIMET, J.; LORTAT-JACOB, H.; RUIGROK, R.W.; ZARSKI, J.P.; DROUET, E. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virol.**, v. 292, p. 162-68, 2002.
- GHOSHAL, A.; DAS S.; GHOSH, S.; MISHRA, M.K.; SHARMA, V.; KOLI, P.; SEN, E.; BASU, A. Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. **Glia**, v. 55, n.5, p. 483-96, 2007.
- GOLLINS, S. W.; PORTERFIELD, J. S. PH-dependent fusion between the flavivirus West-Nile and liposomal model membranes. **J. Gen. Virol.**, v. 67, p. 157-66, 1986.
- GOULD, E.A.; CLEGG, J.C.S. Growth, Titration and Purification of Togaviruses. *In*: MAHY, B.W.J. (ed). **Virology: a practical approach**. Washington DC: IRL Press. p. 43-78, 1985.
- GRASSMANN, C.W.; ISKEN, O.; BEHRENS, S.E. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhea virus during RNA replication: An in vivo and in vitro study. **J. Virol.**, v. 73, n. 11, p. 9.196-205, 1999.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microb. Rev.**, v. 11, n. 3, p. 480-96, 1998.
- GUBLER, D.J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Found Symp.**, v. 277, p. 3- 16, 2006.
- GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **J. Clin. Virol.**, v. 27, p. 1-13, 2003.
- HALSTEAD, S.B.; O'ROURKE, E.J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The J. Experim. Med.**, v. 146, n.1, p. 201-17, 1977.

- HALSTEAD, S.B.; DIWAN, A.R.; MARCHETTE, N.J., PALUMBO, N.E.; SRISUKONTH, L. Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells: Attributes of uncloned virus at different passage levels. **Am. J. Trop. Med Hyg.** v. 33, p. 654-65, 1984.
- HAMMOM, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of Philippine and Thailand. **Science**, v. 131, p. 1.102-03, 1960.
- HASEGAWA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOSAKA, T.; FUJITA, S.; KOBAYASHI, Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. **J. Virol.** v.191, p.158-65, 1992.
- HEINZ, F.X.; ALLISON, S.L. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. **Adv. Virus Res.** v. 55, p. 231-69, 2000.
- HILGARD P, STOCKERT R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. **Hepatology.**, v. 32, n.5, p. 1.069-77, 2000.
- HIRAMATSU, K.; TADANO, M.; MEN, R.; LAI, C.J. Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence. **Virology**, v. 224, n.2, p. 437-45, 1996.
- HOLDEN KL, STEIN DA, PIERSON TC, AHMED AA, CLYDE K, IVERSEN PL, HARRIS E. Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. **Virology**, v. 344, n. 2, p. 439-52, 2006.
- HOLMES, E. C.; WOROBEY M.; RAMBAUT A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. **Mol. Biol. Evol.**, v. 16, n.3, p.405-9, 1999.
- HOTTA, S. Experimental studies on dengue. Isolation, identification and modification of the virus. **J. Infec. Dis.** v. 90, p. 1-9, 1952.
- JACOBS, M.G.; ROBINSON, P.J.; BLETCHLY, C.; MACKENZIE, J.M.; YOUNG, P.R. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. **FASEB J.**, v. 14, n. 11, p. 1.603-10, 2000.
- JELACHICH, M.L.; LIPTON, H.L. Theiler's murine encephalomyelitis virus kills restrictive but not permissive cells by apoptosis. **J. Virol.** v. 70, p. 6.856-61, 1996.
- JIRAKANJANAKIT, N.; KHIN, M.M.; YOKSAN, S.; BHAMARAPRAVATI, N. Dynamics of susceptibility and transmissibility of the live, attenuated, candidate vaccines dengue-1 PDK13, dengue-3 PGMK30F3, and dengue-4 PDK48 after oral infection in *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, n.4, p. 672-76, 1999.

- JOHNSON, A.J.; GUIRAKHOO, F.; ROEHRIG, J.T. The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. **Virology**, v. 203, n. 2, p 241-49, 1994.
- JOHNSON, G.; NELSON, S.; PETRIC, M.; TELLIER, R. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. **J. Clin. Microb.**, v. 38, n. 9, p. 3.274-79, 2000.
- KAWANO, H., ROSTAPSHOV, V., ROSEN, L., LAI, C.J. Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice. **J. Virol.**, v. 67, n. 11, p. 6.567-75, 1993.
- KHROMYKH, A. A.; SEDLAK, P. L.; GUYATT, K. J.; HALL, R. A.; WESTAWAY, E. G. Efficient trans-complementation of the flavivirus Kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. **J. Virol.**, v. 73, p. 10.272-80, 1999.
- KREIL, T.R.; EIBL, M.M. Nitric oxide and viral infection-No antiviral activity against a flavivirus in vitro, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection in vivo. **Virology**, v. 219, p. 304–30, 1996.
- LANCIOTTI, R. S. CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G.J.; VORNDAM, V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 3, p. 545-51, 1992.
- LEE, E.; WEIR, R. C.; DALGARNO, L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passing and their localization on the three-dimensional structure of the protein. **Virology**. v. 232, p. 281-90, 1997.
- LEITMEYER, K. C.; VAUGHN, D. W.; WATTS, D. M.; SALAS, R.; VILLALOBOS, I.; DE CHACON, RAMOS. C.; RICO-HESSSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis **J. Virol.**, v. 73, p. 4.738–47, 1999.
- LEONG, A.S.; WONG, K.T.; LEONG, T.Y., TAN, P.H, WANNAKRAIROT, P. The pathology of dengue hemorrhagic fever. **Semin. Diagn. Pathol.**, v. 24, n. 4, p. 227-36, 2007.
- LIAO, C.L.; LIN, Y.L.; WANG, J.J.; HUANG, Y.L.; YEH, C.T.; MA, S.H.; CHEN, L.K. Effect of enforced expression of human Bcl-2 on Japanese encephalitis virus-induced apoptosis in cultured cells. **J. Virol.**, v. 71, p. 5.963–71, 1997.
- LIBRATY, D.H.; YOUNG, P.R.; PICKERING, D.; ENDY, T.P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A.L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 8, p. 1.165-68, 2002.

- LINDENBACK, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication: *In*: KNIPE, D. M.; HOWLWY, P. M.; FIELDS, B. N.: **Fields Virology**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. New York. p. 991-1.042, 2001.
- LOSSI, L.; GAMBINO, G. Apoptosis of the cerebellar neurons. **Histol. Histopathol.** v. 23, n. 3, p. 367-80, 2008.
- LOZACH PY, BURLEIGH L, STAROPOLI I, NAVARRO-SANCHEZ E, HARRIAGUE J, VIRELIZIER JL, REY FA, DESPRÈS P, ARENZANA-SEISDEDOS F, AMARA A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 25, p. 23.698-708, 2005.
- LUM, LCS, LAM, SK, CHOY, YS, GEORGE, R, HARUN, F, 1996. Dengue encephalitis: A true entity? **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 54, n. 3, p. 256-59, 1996.
- MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nat. Med.**, v. 10, n. 12, p. 98-109, 2004.
- MACKENZIE, J.M.; JONES, M.K.; YOUNG, P.R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, n.1, p. 232-40, 1996.
- MALAVIGE, G. N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D. J. & SENEVIRATNE, S.L. Dengue viral infections. **Postgraduate Med. J.**, v. 80, p. 588-601, 2004.
- MATUSAN, A.E.; KELLEY, P.G.; PRYOR, M.J.; WHISSTOCK, J.C.; DAVIDSON, A.D.; WRIGHT, P.J. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS3 proteinase and the production of growth-restricted virus. **J. Gen. Virol.**, v. 82, n. 7, p. 1647-56, 2001.
- MENSAH, P.L. An electron microscopical study of neuronal cell clustering in postnatal mouse striatum, with special emphasis on neuronal cell death. **Anat. Embryol. (Berl)**, v. 164, n.3, p. 387-401, 1982.
- MESSER, W.B.; VITARANA, U.T.; SIVANANTHAN, K.; ELVTIGALA, J.; PREETHIMALA, L.D.; RAMESH, R.; WITHANA, N.; GUBLER, D.J.; DE SILVA, A.M. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 765-73, 2002.
- MIAGOSTOVICH M.P.; DOS SANTOS F.B.; FUMIAN T.M.; GUIMARÃES F.R.; DA COSTA E.V.; TAVARES F.N.; COELHO J.O.; NOGUEIRA R.M. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. **Mem. Inst. Osw. Cruz.** v.101, n. 3, p.307-13, 2006.
- MIAGOSTOVICH, M.P.; RAMOS, R.G.; NICOL, A.F. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin. Neuropathol.** v. 16, p. 204-08, 1997.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância em saúde, 2003.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância em saúde, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância em saúde, 2007. (<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue1203.pdf>). Acesso em 30 de setembro de 2007.
- MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, p. 313-19, 2004.
- MORENS, D.M.; MARCHETTE, N.J.; CHU, M.C.; HALSTEAD, S.B. Growth of dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 45, n. 5, p. 644-51, 1991.
- MORI, M.; KURANE, I.; JANUS, J.; ENNIS, F.A. Cytokine production by dengue virus antigen-responsive human T lymphocytes in vitro examined using a double immunocytochemical technique. **J. Leukoc. Biol.**, v. 61, n. 3, p. 338-45, 1997.
- MOSQUERA, J.A.; HERNANDEZ, J.P.; VALERO, N.; ESPINA, L.M.; AÑEZ, G.J. Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes. **Virology**, v. 31, p. 2-26, 2005.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews: Microbiol.**, v. 3, p. 13-22, 2005.
- MUÑOZ-JORDÁN JL, SÁNCHEZ-BURGOS GG, LAURENT-ROLLE M, GARCÍA-SASTRE A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p.14.333–38, 2003.
- MUÑOZ-JORDÁN, J.L.; LAURENT-ROLLE, M.; ASHOUR, J.; MARTÍNEZ-SOBRIDO, L.; ASHOK, M.; LIPKIN, W.I.; GARCÍA-SASTRE, A. Inhibition of alpha/ beta Interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **J. Virol.** v. 79, p. 8.004–13, 2005.
- MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K.; GARY, G.W.; WHITFIELD, M.S.; FORRESTER F.T. St. Louis encephalitis virus infection of mice. **Lab. Invest.**, v. 19, p. 652–62, 1968.
- NAVARRO-SANCHEZ, E. ; ALTMAYER, R. ; AMARA, A. ; SCHWARTZ, O. ; FIESCHI, F. ; VIRELIZIER, J.L. ; ARENZANA-SEISDEDOS, F. ; DESPRÉS, P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO Rep.**, v. 4, n. 7, p. 723-28, 2003.
- NOGUEIRA R. M.; MIAGOSTOVICH M. P.; LAMPE E.; SCHATZMAYR H. G. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 253, 1990.

- NOGUEIRA, R.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; DE FILIPPIS, A.M.; PEREIRA, M.A.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 96, n.7, p. 925-26, 2001.
- NOGUEIRA, R.M.; FILLIPIS, A. M.; COELHO, J. M., SEQUEIRA, P.C.; SCHATZMAYR, H. G.; PAIVA, F. G.; RAMOS A. M.; MIAGOSTOVICH, M. P. Dengue virus infection of central nervous system (CNS): a case report from Brazil. **Southeast Asian J. Trop. Méd. Public Health.**, v. 33, n.1, p. 68-71, 2002.
- PALMA-da-CUNHA-MATTA, A.; SOARES-MORENO, S.A.; CARDOSO-DE ALMEIDA, A.; AQUILERA-DE-FREITAS, V.; CAROD-ARTAL, F.J. Neurological complications arising from dengue virus infection. **Ver. Neuro.**, v. 39, p. 233-37, 2004.
- PATEY, O.; OLLIVAUD, C.; BREUIL, J.; LAFAX, C. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, p. 793–802, 1993.
- PFEIFFER, J.K.; KIRKEGAARD, K. Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 103, n.14, p. 5.520-25, 2006.
- POERSCH C.P.O.; PAVONI, DP, QUEIROZ, M.H.; DE BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; DOS SANTOS C.N.; KRIEGER, M.A. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **J. Clin. Virol.** p. 32, v. 4, p. 272-77, 2005.
- PUTNAK, J.; COLLER, B.A.; VOSS, G.; VAUGHN, D.W.; CLEMENTS, D.; PETERS, I.; BIGNAMI, G.; HOUNG, H.S.; CHEN, R.C.; BARVIR, D.A. SERIWATANA, J.; CAYPHAS, S.; GARÇON, N.; GHEYSEN, D.; KANESA-THASAN, N.; MCDONELL, M.; HUMPHREYS, T.; ECKELS, K.H.; PRIEELS, J.P.; INNIS, B.L. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine**, v. 23, n. 35, p. 4.442-52, 2005.
- PUTNAK, J.R.; KANESA-THASAN, N.; INNIS, B.L. A putative cellular receptor for dengue viruses. **Nature Med.**, v. 3, p. 828–29, 1997.
- PUTNAK, R.J.; COLLER, B.A.; VOSS, G.; VAUGHN, D.W.; CLEMENTS, D.; PETERS, I.; BIGNAMI, G.; HOUNG, H.S.; CHEN, R.C.; BARVIR, D.A.; SERIWATANA, J.; CAYPHAS, S.; GARÇON, N.; GHEYSEN, D.; KANESA-THASAN, N.; MCDONELL, M.; HUMPHREYS, T.; ECKELS, K.H.; PRIEELS, J.P.; INNIS, B.L. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine**, v. 23, p. 4.442–52, 2005.
- QUADRI, R.; NEGRO, F. Are there any subgenomic forms of hepatitis C virus RNA in the liver? **Dig. Liver Dis.**, v. 33, n.6, p. 480-86, 2001.

- RAMOS, C.; BOSHELL, J.; MESA, M. T. R.; NOGUEIRA, R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244-51, 1997.
- RAMOS, C.; SÁNCHEZ, G.; PANDO, H.R.; BAQUERA, J.; HERNÁNDEZ, D. MOTA, J.; RAMOS, J.; FLORES, A.; LLAUSÁS, E. Dengue virus in the brain of fatal case of hemorrhagic dengue fever. **J. Neuro Virol.** v. 4, p. 465-68, 1998.
- REY, F.A.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.; KUNZ, C.; HARRISON, S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2A ° resolution. **Nature**, v. 375, p. 291-98, 1995.
- REY, F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 100, n.12 p. 6.899-901, 2003.
- RICE, C.M. *Flaviviridae*: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**, p. 931-960. New York: Raven Press, 1996.
- RICO-HESSE, R. Dengue virus evolution and virulence models. **Clin. Infect. Dis.** v. 44, n. 11, p. 1.462-6, 2007.
- RICO-HESSE, R. L. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, p. 479- 93, 1990.
- RICO-HESSE, R.; HARRISON, L. M.; SALAS, R. A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RIGAU-PÉREZ J. G.; CLARK G.G; GLUBER D.J. REITER P.; SANDERS E. J, VORDAM, A. V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v. 352, p. 971-77, 1998.
- RIGAU-PÉREZ, J.; CLARK, G. ; GUBLER, D.; REITER, P. ; SANDERS, E. ; VORNDAM, A. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet.**, v. 352, p. 971-977, 1998.
- ROIZMAN, B; PALESE, P. Multiplication of viruses: An Overview. *In*: FIELDS, B. N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology** - Third edition, p. 101-12, 1996
- ROSEN, L. "The emperor's new clothes" revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 26, p. 337-43, 1977.
- RUSH, B. An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia, in the summer and autumn of the year 1780. *In*: **Medical Inquires and observations.** p. 89-100. Prichard and Hall, Philadelphia, 1789.
- SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **Am, J, Trop Med. Hyg.** v.1, p. 30-50, 1952.
- SABIN, A. B.; SCHLESINGER, R. W. Production of imunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, v. 101, p. 640-42, 1945.

- SAMPATH, A.; XU, T.; CHAO, A.; LUO, D.; LESCAR, J.; VASUDEVAN, S.G. Structure-based mutational analysis of the NS3 helicase from dengue virus. **J. Virol.**, v. 80, n. 13, p. 6.686–90, 2006.
- SÁNCHEZ, I.J.; RUIZ, B.H. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p. 2.541-45, 1996.
- SÁNCHEZ-SECO, M.P.; ROSARIO, D.; DOMINGO, C.; HERNÁNDEZ, L.; VALDÉS, K.; GUZMÁN, M.G.; TENORIO, A. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. **J. Virol. Methods**, v. 126, n. 1-2, p. 101-09, 2005.
- SARKAR, J.K.; MONDAL, A.; CHAKARAVARTY, S.K.; CHATTERJEE, S.N.; PAL, S.R. Isolation of dengue virus from the blood of a clinical case of encephalitis. **Indian. J. Med. Res.**, v. 57, n.9, p. 1.616-20, 1969.
- SAXENA, V.; MATHUR, A.; KRISHNANI, N.; DHOLE, T.N. An insufficient anti-inflammatory cytokine response in mouse brain is associated with increased tissue pathology and viral load during Japanese encephalitis virus infection. **Arch. Virol.**, v. 153, n. 2, p. 283-92, 2008.
- SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA R.M.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v. 81, p. 245-46, 1986.
- SHELLAM, G.R.; SANGSTER, M.Y.; UROSEVIC, N. Genetic control of host resistance to flavivirus infection in animals. **Rev. Sci. Tech.**, v. 17, n. 1, p. 231-48, 1998.
- SHRESTA, S.; SHARAR, K. L.; PRIGOZHIN, D.M.; BEATTY, P.R.; HARRIS, E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. **J. Virol.**, v. 80, n. 20, p. 10.208-17, 2006.
- SILER, J. F.; HALL, M.W.; HITCHENS, A.P. Dengue, its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Philippine J. Sci.**, v. 29, p. 1-304, 1926.
- SINGLETON, M.R.; WIGLEY, D.B. Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. **J. Bacteriol.**, v. 184, n.7, p. 1.819-26, 2002.
- SOLOMON, T.; DUNG, N.M.; VAUGHN, D.W.; KNEEN, R.; THAO, L.T.; RAENGSAKULRACH, B.; LOAN, H.T.; DAY, N.P.; FARRAR, J.; MYINT, K.S.; WARRELL, M.J.; JAMES, W.S.; NISALAK, A.; WHITE, N.J. Neurologic manifestations of dengue infection. **Lancet.**, v. 355, p. 1.053-59, 2000.
- STIASNY, K.; ALLISON, S.L.; BAUER, A.M.; KUNZ C.; HEINZ, F.X. Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. **J. Virol.**, v. 70, n. 11, p. 8.142-47, 1996.

- STIASNY, K.; KÖSSL C.; HEINZ, F.X. Differences in the postfusion conformations of full-length and truncated class II fusion protein E of tick-borne encephalitis virus. **J. Virol.**, v. 70, n. 10, p. 6.511-15, 2005.
- SUMARMO, H.W.; JAHJA, E.; GUBLER, D.J.; SUHARYONO, W.; SORENSEN, K. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. **Bull WHO**, v. 61, p. 693-701, 1983.
- SUMARMO, H.W.; JAHJA, E.; GUBLER, D.J.; SUTOMENGGOLO, T.S.; SAROSO, S.J. Encephalopathy associated with dengue virus. **Lancet.**, p. 449-50, 1978.
- SUZUKI, R.; DE BORBA, L.; DUARTE DOS SANTOS, C.N.; MASON, P.W. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology**, v. 326, n. 2, p. 374-83, 2007.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIACK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nuc.l Acid. Res.**, v. 24, p. 4.876–82, 1997.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acid. Res.**, v. 22, p. 4.673–80, 1994.
- TILGNER, M., DEAS, T.S., AND SHI, P.Y. The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. **Virology**, v. 331, p. 375–86, 2005.
- TSAI, K.N.; TSANG, S.F.; HUANG, C.H.; CHANG, R.Y. Defective interfering RNAs of Japanese encephalitis virus found in mosquito cells and correlation with persistent infection. **Virus Res.**, v. 124, n.1-2, p. 139-50, 2007.
- TUTEJA, N.; TUTEJA, R. Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, n. 10, p. 1.849-63, 2004.
- UMAREDDY, I.; CHAO, A.; SAMPATH, A.; GU, F.; VASUDEVAN S.G. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **J. Gen. Virol.**, v., 87, p. 2.605–14, 2006.
- VIGNUZZI, M.; STONE, J.K.; ARNOLD, J.J.; CAMERON, C.E.; ANDINO, R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. **Nature**, v. 439, p. 344-48, 2006.
- WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARRETT, A.D.; WATOWICH, S.J.; GUBLER, D.J.; WEAVER, S.C. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J. Virol.**, v. 74, n. 7, p. 3.227-34, 2000.

- WANG, T.; TOWN, T.; ALEXOPOULOU, L.; ANDERSON, J.F.; FIKRIG, E.; FLAVELL, R.A. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. **Nat. Med.**, v. 10, n. 12, p. 1366-73, 2004.
- WEAVER, S.C.; BARRET, A.D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature reviews**. v. 2, p. 789-801, 2004.
- WESTAWAY, E. G. Flavivirus replication strategy. **Adv. Virus. Res.**, v. 33, p. 45-90, 1987.
- WESTAWAY, E.G.; MACKENZIE, J.M.; KHROMYKH, A.A. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. *In*: CHAMBERS, T.J.; MONATH, T.P. **Advances in Virus Research. The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development**, California: Elsevier Academic Press, v. 59, p.235-89, 2003.
- WHITEHEAD, S.S.; BLANEY, J.E.; DURBIN, A.P.; MURPHY, B.R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n. 7, p. 518-28, 2007.
- WHO. What is dengue and how is it treated? Geneva, Switzerland: **World Health Organization**. (<http://www.who.int/features/qa/54/en/>). Acesso em Outubro de 2007.
- WU, S.J.; GROUARD-VOGEL, G.; SUN, W.; MASCOLA, J.R.; BRACHTEL, E.; PUTVATANA, R.; LOUDER, M.K.; FILGUEIRA, L.; MAROVICH, M.A.; WONG, H.K.; BLAUVELT, A.; MURPHY, G.S.; ROBB, M.L.; INNES, B.L.; BIRX, D.L.; HAYES, C.G.; FRANKEL, S.S. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat. Med.**, v. 6, n. 7, p. 816-20, 2000.
- XU, T.; SAMPATH, A.; CHAO, A.; WEN, D.; NANAQ, M.; CHENE, P.; SUBHASH, G.; LESCAR, J. Structure of the dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4Å. **J. Virol.**, v. 79, n. 16, p. 10278-88, 2005.
- YAMAMOTO, Y.; TAKASAKI, T.; YAMADA, K.; KIMURA, M.; WASHIZAKI, K.; YOSHIKAWA, K.; HITANI, A.; NAKAMURA, T.; IWAMOTO, A. Acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever. **J. Infect. Chemother.**, v. 8, p. 175-77, 2002.
- YOU, S.; PADMANABHAN, R. A novel in vitro replication system for dengue virus. initiation of RNA synthesis at the 3' end of exogenous viral RNA templates requires 5' and 3' terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 33714-22, 1999.
- YU, L.; MARKOFF, L. The topology of bulges in the long stem of the flavivirus 3' stem-loop is a major determinant of RNA replication competence. **J. Virol.**, v. 79, p. 2309-24, 2005.

ANEXO

Anexo 1 -	Artigo publicado <i>in</i> Journal Medical Virology, v. 79, p. 1506–1517, 2007: Dengue neurovirulence in mice: Identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains.....	102
------------------	--	------------