

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

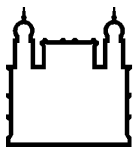
Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

*Camundongos inoculados com DENV2 por  
via intracerebral: histopatologia, detecção viral  
e avaliação de proteção mediada por uma  
vacina de DNA*

*Juliana Fernandes Amorim da Silva*

Rio de Janeiro - RJ - Brasil

Outubro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

*Juliana Fernandes Amorim da Silva*

# *Camundongos inoculados com DENV2 por via intracerebral: histopatologia, detecção viral e avaliação de proteção mediada por uma vacina de DNA*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Ada Maria de Barcelos Alves.

**RIO DE JANEIRO**

Outubro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Juliana Fernandes Amorim da

Camundongos inoculados com DENV2 por via intracerebral:  
histopatologia, detecção viral e avaliação de proteção mediada por uma  
vacina de DNA / Juliana Fernandes Amorim da Silva. – Rio de Janeiro,  
2015.

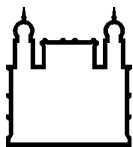
xx, 163 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 96-111

1. Modelo murino. 2. Histopatologia. 3. DENV2. 4. Vacina de DNA. I.  
Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: *Juliana Fernandes Amorim da Silva*

# *Camundongos inoculados com DENV2 por via intracerebral: histopatologia, detecção viral e avaliação de proteção mediada por uma vacina de DNA*

ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Ada Maria de Barcelos Alves

Aprovada em: 29 /10/2015

### EXAMINADORES:

Dr. Marcelo Pelagio (IOC-FIOCRUZ/RJ) - **Presidente**

Dr. Fernando Bozza (IPEC-FIOCRUZ/RJ)

Dra. Flávia Lima (UFRJ/RJ)

Dra. Ester Mota (IOC-FIOCRUZ/RJ) - **Revisora**

Dra. Cecília Jacques (IOC-FIOCRUZ/RJ)

Rio de Janeiro, 29 de Outubro de 2015

*Dedico este trabalho aos que sempre dedicaram suas vidas por mim, meus pais, Carlos e Antonia.*

*Ao meu irmão, Leonardo, que ao nascer trouxe mais alegria para a minha vida.*

*Aos meus avós paternos, Emília e José Maria, que me deram amor e uma enorme família linda. E aos meus avós maternos, Ana e Custódio, que esculpiram com amor quem eu sou hoje em dia.*

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre ouvir minhas preces e por ter colocado pessoas em minha vida que me permitiram chegar onde cheguei e ser quem sou. Também sou muito agradecida às pessoas que me ajudaram, apoiaram e acrescentaram durante esse processo. Esse trabalho foi fruto não só da minha dedicação, mas também da ajuda que recebi de muitos.

Sem meus pais, Antonia e Carlos Augusto e sem meu avós, Ana e Custódio Videira, Emília e José Maria, eu não alcançaria o que almejei. A criação e o amor que recebi deles me tornaram uma pessoa que se esforça por seus ideais. Agradeço o quanto eles se empenharam para me oferecer oportunidades, ao que me ensinaram e ao apoio que me deram em tudo. Este trabalho e tudo o que faço é para orgulhar vocês e tentar demonstrar o quanto sou grata.

Também agradeço ao meu irmão por aturar um pouquinho da minha chatice durante esse processo e pela vida toda, por me fazer companhia e compreender os meus erros.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Ada Alves, que gentilmente me recebeu há 5 anos atrás em seu laboratório, acreditando no meu potencial e investindo em mim. Obrigada por sempre ter me dado atenção, seu tempo e suas idéias para me ajudar, e por ter confiado e permitido que eu fizesse parte da equipe LABIFIV. Tenho muito à agradecer também ao Dr. Marciano, que foi não só um excelente co-orientador, mas também um grande amigo e um anjo. Sem os seus ensinamentos, seu pensar científico e seu empenho para comigo, nada estaria feito. Obrigada por sempre pensar no melhor para mim, por me apoiar, me ouvir e nunca ter me permitido desanimar.

Não tenho como esquecer a ajuda da Dr<sup>a</sup>. Adriana Azevedo que se tornou uma companheira e amiga dentro e fora do laboratório. Agradeço demais por você ter usado seu tempo e paciência para me ajudar nos ensaios de plaque viral e de RT-qPCR, e por ter me incentivado em vários aspectos! Muitas saudades suas! Muito obrigada por tudo que você sempre fez de coração!

À Kíssila, que durante o mestrado me deu de presente sua amizade. Me acalmou nos momentos de estresse, foi uma companheira durante as disciplinas e me divertiu demais. É uma pessoa que fez e faz questão de me ajudar mesmo que eu não peça e doa o melhor de si. Você é mil!

Ao Márcio, Edson e Antonio, amigos que sempre me deram uma mãozinha no laboratório com muita boa vontade. E que me fizeram dar boas risadas e me deixaram mais alegre até nos momentos mais tensos. Obrigada por fazerem parte dessa caminhada!

Quero agradecer também à Dr<sup>a</sup> Simone Costa e Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Nogueira, ambas me incentivaram muito e me tranquilizaram principalmente no crítico final do mestrado. Obrigada por acreditarem que sou capaz e por me ajudarem a resolver pepininhos que apareceram pelo caminho.

Agradeço à Dr<sup>a</sup>. Gisela Freitas Trindade, por ter me ensinado e auxiliado nos experimentos de qPCR, obrigada pela sua atenção e gentileza.

Ao LATEV e às meninas da cultura celular de Biomanguinhos, que foram prestativos demais colaborando conosco nos experimentos com cultura de células.

À Dr<sup>a</sup>. Ester Mota por colaborar conosco, disponibilizando seu laboratório e nos auxiliando em técnicas histopatológicas. Além disso, muito obrigada por ser tão atenciosa e revisar esse meu trabalho escrito.

Sou grata também às meninas integrantes do LABIFIV (Natália Gedeão, Paolla Beatriz, Nathália Rocha), que de alguma forma me ajudaram no dia à dia do laboratório.

Agradeço aos ex-integrantes do LABIFIV (Tiago, Manu, Fernanda, Tamires, Eduardo, Maysa, Giulia e Rafa), que durante o período que fizeram parte do laboratório me proporcionaram bons momentos e muita ajuda. Deixo um obrigado especial para o Rafa, que ao chegar me ofereceu de coração sua amizade e nunca me deixou na mão. Obrigada por ser quem você foi pra mim!

Um agradecimento aos profissionais do Gafree, em especial aos técnicos Edimilson e Geraldo que foram importantes no andamento do meu trabalho, nas técnicas histopatológicas, sendo sempre muito atenciosos. E ao Dr. Basílio - de - Oliveira, que sempre disponibilizou o espaço e a ajuda.

Os amigos que nos cercam fora do ambiente de laboratório foram essenciais para me impulsionar e falar aquele: “Falta pouco! Força!” (principalmente estes: Marcela, Débora, Bárbara, Yasmim, Naiara, Laura, Raphael, Ana Luiza e Laryssa). Marcela, obrigada por estar do meu lado durante tantos anos de amizade e por sempre torcer por mim e celebrar com as minhas conquistas! Ana e Lary, seja na forma de incentivo ou nas horas de descontração, todos os seus conselhos foram de extremo valor. Muito obrigada pela a companhia de ouro de vocês e por me concederem essa amizade tão bonita! E obrigada Rapha, pela excelente companhia e por me dar força, mesmo estando longe, durante todo o processo de escrita da dissertação. Você fez diferença!

Quero também agradecer à pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, que me deu a oportunidade de dar continuidade ao meu aprendizado na pesquisa. E também agradeço muito pela disponibilidade da banca examinadora e pela sua contribuição.

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”*

*(Cora Coralina)*

*“Se as coisas são inatingíveis... ora! Não é motivo para não querê-las... Que tristes os caminhos, se não fora a presença distante das estrelas!”*

*(Mario Quintana)*



# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## Camundongos inoculados com DENV2 por via intracerebral: histopatologia, detecção viral e avaliação de proteção mediada por uma vacina de DNA

### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

A dengue constitui um sério problema de saúde pública, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Uma grande dificuldade para se estudar essa doença é a falta de um modelo animal que reproduza os efeitos da infecção observados em humanos. Apesar disso, um dos modelos mais utilizados para testes de vacinas contra a dengue se baseia na inoculação em camundongos por via intracerebral (i.c.) de vírus neuroadaptado. No entanto, poucos estudos avaliaram o efeito da infecção i.c. e/ou proteção gerada por protótipos vacinais em diferentes órgãos, tais como fígado, um dos órgãos comprometidos pela dengue em humanos. O nosso grupo construiu a vacina de DNA, pcTPANS1, que induziu altos níveis de sobrevivência em camundongos desafiados por via i.c. com vírus da dengue 2 (DENV2). Diante disso, o presente trabalho se propõe avaliar aspectos da patogênese no cérebro, cerebelo, fígado e pulmão, no modelo de camundongos BALB/c inoculados pela via i.c. com uma dose letal de DENV2, em diferentes dias após infecção (d.p.i.). Adicionalmente, tais análises foram estendidas para animais imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com DENV2. Detectamos alterações histopatológicas no cérebro/cerebelo (edema, hemorragia, gliose reacional, microglia hiperplásica e hipertrofiada e infiltrado mononuclear na pia-máter, no neurópilo e perivasculares), no fígado (edema, hemorragia, balonização hepatocitária, infiltrado mononuclear, hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer) e no pulmão (edema, hemorragia, infiltrados mononucleares peribronquiolares, aumento do número de macrófagos alveolares e espessamento de septo interalveolar). Alguns destes danos foram quantificados, utilizando uma escala subjetiva com atribuição de diferentes graus, revelando diferenças significativas. Os animais inoculados com DENV2 também apresentaram um aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST, principalmente de AST ao final da infecção, com diferenças significativas em relação aos controles. Por outro lado, em todos os tecidos dos camundongos vacinados com pcTPANS1 observamos uma melhora progressiva dos danos, quando comparados com os animais somente infectados. Também detectamos a presença do DENV2 no cérebro/cerebelo, no sangue e no pulmão dos animais em ensaios *in vitro* de infecção de células Vero e/ou por RT-PCR em tempo real. Nos animais somente infectados, observamos no cérebro/cerebelo altos títulos de partículas virais infecciosas e cópias de RNA viral. Já no soro, o maior percentual de animais com a presença de DENV2 foi entre o 9<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> d.p.i.. Por outro lado, não foi possível a detecção do vírus no fígado, e no pulmão a detecção foi muito baixa. Entretanto, verificamos a presença do antígeno NS3 de DENV2 não só no tecido nervoso, mas também no hepático, através de ensaios de imunohistoquímica. Em contrapartida, os animais vacinados com pcTPANS1 e desafiados com o vírus apresentaram uma redução drástica na viremia com DENV2. De um modo geral, os nossos estudos podem contribuir para uma melhor compreensão da patogênese da dengue, assim como servir de parâmetro para a avaliação da proteção induzida pela vacina pcTPANS1, bem como de outras vacinas.

# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

## Mice intracerebrally inoculated with DENV2: histopathology, virus detection and evaluation of protection mediated by a DNA vaccine

### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

The dengue is a serious public health problem, mainly in tropical and subtropical regions of the world. One of the great difficulty to study this disease is the lack of an animal model that mimics the infection effects observed in humans. Nevertheless, one of the most widely used model for vaccine tests against dengue is based on the inoculation of mice by the intracerebral route (i.c.) with neuroadapted virus. However, few studies have evaluated the effects of i.c. infection and/or protection generated by vaccine prototypes in different organs, such as the liver, one of the compromised organ in dengue in humans. Our group have constructed a DNA vaccine, pcTPANS1, which induced high survival rates in mice challenged by the i.c. inoculation with dengue virus 2 (DENV2). Therefore, the present work aim to evaluate aspects of the pathogenesis in the brain, cerebellum, liver and lung in the BALB/c mouse model intracerebrally inoculated with a lethal dose of DENV2, at different days post infection (d.p.i.). In addition, these analyzes were extended to pcTPANS1-immunized animals challenged with DENV2. We detect histopathological changes in the brain/cerebellum (hemorrhage, edema, reactive gliosis, hyperplasic and hypertrophied microglia and mononuclear infiltrate in the pia-mater, neuropile and perivascular), the liver (hemorrhage, edema, hepatocyte ballooning, mononuclear infiltrate, hyperplasia and hypertrophy of Kupffer cells) and the lung (hemorrhage, edema, peribronchial mononuclear infiltrates, increased number of alveolar macrophages and thickening of interalveolar septa). Some of these damages were quantified using a subjective scale with different degrees and revealing significant differences. Animals inoculated with DENV2 also showed increased serum levels of the liver enzymes AST and ALT, mainly AST on the end of infection, with significant differences compared to controls. On the other hand, in all the tissues of pcTPANS1-vaccinated mice, we observed a progressive improvement of damages when compared with only infected animals. We also detected the presence of DENV2 in the brain/cerebellum, blood and lung of animals by *in vitro* assays of infected Vero cells and/or by real time RT-PCR. In only infected animals, we observed high titers of infectious viral particles and viral RNA copies in brain/cerebellum. In serum, the highest percentage of animals with infeccious DENV2 particles was found between 9<sup>0</sup> and 11<sup>0</sup> d.p.i.. However, it was not possible to detect the virus in the liver, and the detection in lung was very low. Despite of this, we verified the presence of DENV2 antigen, NS3, not only in nervous tissue but also in liver, by immunohistochemistry assays. In contrast, pcTPANS1-vaccinated animals challenged with the virus showed a drastic reduction of viremia with DENV2. In general, our studies may contribute to a better understanding of dengue pathogenesis, and also serve as a parameter for evaluation of the vaccine-induced protection with pcTPANS1, as well as with other vaccines.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Presença da dengue no mundo em 2014 .....	2
<b>Figura 1.2</b>	Representação esquemática do genoma de RNA de fita simples do vírus da dengue e da conformação madura e imatura da partícula viral .....	4
<b>Figura 1.3</b>	Ciclo replicativo do vírus do dengue.....	6
<b>Figura 1.4</b>	Representação esquemática das seis camadas de células neuronais no córtex cerebral em corte longitudinal do encéfalo.....	26
<b>Figura 1.5</b>	Representação esquemática da substância cinzenta e da substância branca do tecido cerebelar .....	27
<b>Figura 1.6</b>	Morfologia do lóbulo hepático e suas estruturas vasculares e celulares.....	28
<b>Figura 1.7</b>	Morfofisiologia do tecido pulmonar .....	29
<b>Figura 1.8</b>	Citoarquitetura dos alvéolos pulmonares .....	30
<b>Figura 3.1</b>	Representação esquemática do plasmídeo pcTPANS1 .....	33
<b>Figura 3.2</b>	Cinética de infecção dos camundongos inoculados com DENV2 por via i.c.....	34
<b>Figura 3.3</b>	Cinética de infecção dos camundongos imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2 por via i.c.....	35
<b>Figura 4.1</b>	Susceptibilidade de camundongos à infecção com DENV2 .....	43
<b>Figura 4.2</b>	Aspectos histopatológicos do tecido cerebral em camundongos BALB/c infectados (1 <sup>o</sup> d.p.i.) com DENV2 ou inoculados com <i>mock</i> .....	45
<b>Figura 4.3</b>	Aspectos histopatológicos do tecido cerebral em camundongos BALB/c infectados (3 <sup>o</sup> , 5 <sup>o</sup> , 7 <sup>o</sup> e 10 <sup>o</sup> d.p.i) com DENV2.....	46
<b>Figura 4.4</b>	Aspectos histopatológicos do tecido cerebelar em camundongos BALB/c infectados (1 <sup>o</sup> , 3 <sup>o</sup> , e 10 <sup>o</sup> d.p.i.) com DENV2 ou inoculados com <i>mock</i> ....	47
<b>Figura 4.5</b>	Análise semiquantitativa das alterações no tecido cerebral dos camundongos infectados com DENV2, nos dias 1 <sup>o</sup> , 3 <sup>o</sup> , 5 <sup>o</sup> , 7 <sup>o</sup> e 10 <sup>o</sup> d.p.i.....	48
<b>Figura 4.6</b>	Título de partículas virais infecciosas no cérebro/cerebelo de camundongos BALB/c inoculados com DENV2.....	49

<b>Figura 4.7</b>	Quantificação do número de cópias do RNA viral no cérebro/cerebelo de camundongos BALB/c infectados com DENV2 através de RT-qPCR.....	50
<b>Figura 4.8</b>	Detecção da proteína NS3 no tecido cerebral de camundongos BALB/c infectados com DENV2 .....	52
<b>Figura 4.9</b>	Detecção da proteína NS3 no tecido cerebelar de camundongos BALB/c infectados com DENV2 .....	53
<b>Figura 4.10</b>	Aspectos histopatológicos do tecido hepático em camundongos BALB/c infectados (1 <sup>o</sup> , 3 <sup>o</sup> e 5 <sup>o</sup> d.p.i.) com DENV2 ou inoculados com <i>mock</i> ....	56
<b>Figura 4.11</b>	Aspectos histopatológicos do tecido hepático em camundongos BALB/c infectados (7 <sup>o</sup> e 10 <sup>o</sup> d.p.i.) com DENV2 ou inoculados com <i>mock</i> .....	57
<b>Figura 4.12</b>	Quantificação das alterações no tecido hepático dos camundongos infectados e do grupo <i>mock</i> .....	58
<b>Figura 4.13</b>	Níveis séricos das enzimas AST (A) e ALT (B) dos animais infectados com DENV2.....	59
<b>Figura 4.14</b>	Detecção da proteína NS3 no tecido hepático de camundongos BALB/c infectados com DENV2 no 1 <sup>o</sup> e 10 <sup>o</sup> d.p.i.....	61
<b>Figura 4.15</b>	Aspectos histopatológicos do tecido pulmonar em camundongos BALB/c infectados com DENV2 ou inoculados com <i>mock</i> . .....	64
<b>Figura 4.16</b>	Quantificação das alterações no tecido pulmonar dos camundongos infectados e do grupo <i>mock</i> .....	65
<b>Figura 4.17</b>	Susceptibilidade de camundongos vacinados ou não à infecção com DENV2.....	66
<b>Figura 4.18</b>	Aspectos histopatológicos do tecido cerebral em camundongos BALB/c imunizados com o pcTPANS1 e desafiados com DENV2 .....	69
<b>Figura 4.19</b>	Quantificação das alterações no tecido cerebral dos camundongos infectados com DENV2 e dos vacinados com o pcTPANS1 e desafiados.....	70
<b>Figura 4.20</b>	Aspectos histopatológicos do tecido cerebelar em camundongos BALB/c imunizados com o pcTPANS1 e desafiados com DENV2.....	71
<b>Figura 4.21</b>	Proporção de animais positivos para a detecção de DENV2, vacinados ou não com o pcTPANS1 .....	72

<b>Figura 4.22</b>	Aspectos histopatológicos do tecido hepático em camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2 .....	74
<b>Figura 4.23</b>	Aspectos histopatológicos do tecido hepático de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 desafiados com DENV2 .....	75
<b>Figura 4.24</b>	Quantificação das alterações no tecido hepático dos camundongos infectados com DENV2 vacinados ou não com o pcTPANS1 .....	76
<b>Figura 4.25</b>	Níveis séricos das enzimas AST (A) e ALT (B) dos animais infectados com DENV2 vacinados ou não com o pcTPANS1 e camundongos naïves.....	77
<b>Figura 4.26</b>	Aspectos histopatológicos do tecido pulmonar em camundongos BALB/c imunizados e infectados com DENV2.....	79
<b>Figura 4.27</b>	Quantificação das alterações no tecido pulmonar dos camundongos vacinados e infectados com DENV2.....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b>	Classificação revisada da gravidade da dengue segundo a OMS.....	12
<b>Tabela 4.1</b>	Detecção de partículas virais infecciosas no soro dos camundongos BALB/c inoculados com DENV2 .....	54
<b>Tabela 4.2</b>	Número de camundongos BALB/c positivos para presença de partículas de DENV2 no soro.....	72

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADE	aumento da replicação viral dependente de anticorpos (do inglês <i>antibody dependent enhancement</i> )
ALT	alanina aminotransferase
<i>AmpR</i>	gene de resistência à ampicilina
AST	aspartato aminotransferase
BGH	hormônio de crescimento bovino (do inglês, <i>bovine growth hormone</i> )
CDC	do inglês, Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CMC	meio semi sólido de carboximetilcelulose
CMV	citomegalovírus humano
ColE1	origem de replicação em <i>E. coli</i>
CpG	dinucleotídeo 5'-CG-3' (Citosina-fosfato-guanina)
DAB	cromógeno diaminobenzidina
DENV	vírus dengue
DENV1	vírus dengue sorotipo 1
DENV 2	vírus dengue sorotipo 2
DENV2 NGC	vírus dengue sorotipo 2 cepa Nova Guiné
DENV4	vírus dengue sorotipo 4
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>dNTP</i>	desoxirribonucleotídeos Fosfatados
d.p.i.	dias pós infecção
dsRNA	ácido ribonucleico dupla fita
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FAM	fluoróforo 6-carboxifluoresceína
FcγR	receptores de Fc gama (do inglês, <i>Fc gamma receptors</i> )
FD	febre do dengue
FHD	febre hemorrágica do dengue
GPI	glicosil-Fosfatidil-Inositol
H.E	hematoxilina e eosina

HRP	do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>
i.c	inoculação intracerebral
i.d	inoculação intradérmica
i.m	inoculação intramuscular
i.p	inoculação peritonal
i.v	inoculação intravenosa
IFN- $\gamma$	interferon - gama
IgM	imunoglobulina M
kDa	kilodalton
LD <sub>50</sub>	dose letal para 50 % da população em teste (do inglês, <i>lethal doses 50 %</i> )
$\mu$ L	microlitro
mL	mililitro
NTPase	proteína nucleosídeo trifosfatase
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.i	pós - infecção
PBS	tampão fosfato salino (do inglês, <i>phosphate buffered saline</i> )
pcDNA3	plasmídeo comercial (invitrogen)
PCR	reação em cadeia da polimerase
pcTPA	vetor construído a partir do plasmídeo comercial pcDNA3 (Invitrogen) que contém a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA à montante do sítio de clonagem
pcTPANS1	plasmídeo recombinante que codifica o peptídeo sinal t-PA fusionado à proteína NS1 e a região N-terminal da proteína NS2A
PFU	unidade formadora de plaque (do inglês, <i>Plaque forming unit</i> )
PNH	primatas não humanos
Poli A	poliadenilação
Proteína C	proteína do capsídeo
Proteína E	proteína do envelope
Proteína NS1	proteína não estrutural 1
Proteína NS2A	proteína não estrutural 2A
Proteína NS2B	proteína não estrutural 2B
Proteína NS3	proteína não estrutural 3



Proteína NS4A	proteína não estrutural 4A
Proteína NS4B	proteína não estrutural 4B
Proteína NS5	proteína não estrutural 5
Proteína prM	proteína precursora de membrana
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativo
RNA	ácido ribonucleico
RTPase	RNA trifosfatases
RT	transcriptase reversa
RT-PCR	reação em cadeia da transcriptase reversa (do inglês <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> )
RT-qPCR	reação em cadeia da transcriptase reversa em tempo real (do inglês <i>real time quantitative PCR</i> )
s.c	inoculação subcutânea
SCD	síndrome do choque do dengue
SFB	soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
sNS1	proteína não estrutural 1 solúvel
SPF	livre de patógenos (do inglês <i>specific pathogen free</i> )
pSV40	promotor Símio-vírus 40
TNF $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> )
t-PA	ativador de plasminogênio de tecido humano
UTR	região não traduzível (do inglês, <i>untranslated region</i> )
WRAIR	do inglês, Walter Reed Army Institute of Research

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. A dengue e sua epidemiologia.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. No mundo.....	1
1.1.2. No Brasil.....	2
<b>1.2. Vírus da dengue e o ciclo replicativo .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Proteínas Virais .....</b>	<b>7</b>
1.3.1. Proteínas estruturais.....	7
1.3.2. Proteínas não estruturais .....	7
1.3.2.1. Proteína NS1 .....	9
<b>1.4. A doença .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5. Patogênese .....</b>	<b>12</b>
<b>1.6. Resposta imune .....</b>	<b>15</b>
<b>1.7. Vacinas contra a dengue em ensaio clínico .....</b>	<b>17</b>
1.7.1. Vacinas de DNA.....	19
<b>1.8. Modelos animais experimentais para estudo da dengue.....</b>	<b>21</b>
1.8.1. Primatas não-humanos (PNH).....	21
1.8.2. Camundongos imunocompetentes.....	22
1.8.3. Camundongos imunodeficientes .....	23
1.8.4. Camundongos humanizados .....	23
<b>1.9. Morfologia do tecido cerebral/cerebelar, hepático e pulmonar .....</b>	<b>25</b>
1.9.1. Tecido cerebral/cerebelar .....	25
1.9.2. Tecido hepático.....	27
1.9.3. Tecido pulmonar.....	28
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Vírus.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. Plasmídeo vacinal .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3. Infecção dos animais com DENV2 .....</b>	<b>33</b>

<b>3.4. Imunização dos camundongos com a vacina de DNA pcTPANS1 .....</b>	<b>35</b>
<b>3.5. Detecção de DENV2 por ensaio de unidade formadora de plaque .....</b>	<b>36</b>
<b>3.6. Detecção de DENV2 por PCR em tempo real.....</b>	<b>37</b>
<b>3.7. Análise dos níveis séricos das enzimas hepáticas.....</b>	<b>39</b>
<b>3.8. Processamento do material biológico para análises histológicas e imunohistoquímicas.....</b>	<b>39</b>
<b>3.9. Coloração em Hematoxilina e Eosina (H.E).....</b>	<b>39</b>
<b>3.10. Análises histopatológicas.....</b>	<b>40</b>
<b>3.11. Imunohistoquímica .....</b>	<b>40</b>
<b>3.12. Análises estatísticas.....</b>	<b>42</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Camundongos infectados com DENV2.....</b>	<b>43</b>
4.1.1. Sobrevivência e morbidade dos camundongos infectados com DENV2 .....	43
4.1.2. Histopatologia do cérebro e cerebelo dos camundongos infectados com DENV2.....	43
4.1.3. Detecção de partículas infecciosas de DENV2 no tecido nervoso dos camundongos infectados.....	48
4.1.4. Detecção por RT-qPCR de RNA de DENV2 no cérebro e cerebelo dos animais infectados.....	50
4.1.5. Detecção por imunohistoquímica de antígeno viral no cérebro e cerebelo dos animais infectados.....	50
4.1.6. Detecção de partículas infecciosas de DENV2 na circulação .....	54
4.1.7. Histopatologia do fígado dos camundongos infectados .....	54
4.1.8. Detecção dos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST.....	59
4.1.9. Detecção de antígenos virais por imunohistoquímica no tecido hepático do camundongos infectados.....	59
4.1.10. Análises histológicas do tecido pulmonar dos camundongos infectados com DENV2.....	62
<b>4.2. Camundongos vacinados com o pcTPANS1 .....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Sobrevivência e morbidade dos animais imunizados e desafiados .....	66
4.2.2. Análises histológicas do cérebro e cerebelo dos camundongos imunizados com pcTPANS1.....	67

4.2.3. Detecção de DENV2 no sangue dos animais imunizados com pcTPANS1 e desafiados com o vírus .....	71
4.2.4. Análises histológicas do fígado dos camundongos imunizados com pcTPANS1.....	72
4.2.5. Detecção dos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST nos animais imunizados com pcTPANS1.....	76
4.2.6. Análises histológicas do pulmão dos camundongos imunizados com pcTPANS1.....	77
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>95</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>96</b>
<b>9. APÊNDICES .....</b>	<b>112</b>
<b>9.1. Artigo 1: Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route.....</b>	<b>112</b>
<b>9.2. Artigo 2: Cooperation between CD4<sup>+</sup> T cells and humoral immunity is critical for protection against dengue using a DNA vaccine based on the NS1 antigen .....</b>	<b>135</b>

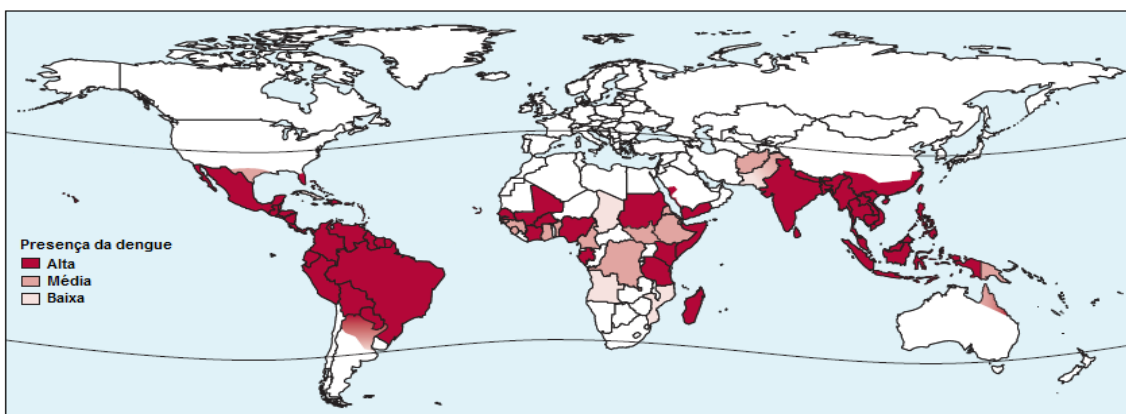
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A dengue e sua epidemiologia

### 1.1.1. No mundo

A dengue, que tem como agente etiológico o vírus da dengue (DENV), tornou-se ao longo dos anos um grande problema de saúde pública e no panorama atual apresenta-se como a arbovirose tropical mais importante transmitida aos humanos (Wang *et al*, 2000; Forattini & Brito, 2003). Atualmente, a dengue é endêmica em mais de 100 países contidos na zona tropical e subtropical do mundo (nas Américas, na Ásia, na África e no Caribe) (Figura 1.1). O DENV é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente pelas espécies *Aedes aegypti* ou *Aedes Albopictus*, vetores adaptados ao clima quente e úmido dos trópicos. Sendo assim, 40% (2,5 bilhões de pessoas) da população mundial vivem em área de risco de infecção por DENV. Estima-se que ocorra 390 milhões de casos de dengue anualmente, dos quais 96 milhões de pacientes manifestam quadros graves da doença em mais de 60 países (Bhatt *et al.*, 2013; WHO, 2014).

O continente asiático detêm 70% do total de infecções por DENV sendo que 34% dessas ocorrem na Índia. As Américas e a África apresentam 14% e 16% das infecções aparentes, respectivamente. Vale ressaltar que mais da metade dos casos americanos ocorrem no Brasil e no México. Já a Oceania contribui com menos de 0,2% dos casos de dengue no mundo (Bhatt *et al.*, 2013). No continente europeu, a última grande epidemia foi entre 1926 e 1928 na Grécia (Murray *et al.*, 2013), sendo eliminada desse continente após o controle do vetor. Entretanto, fatores como o aumento da temperatura, reintrodução do vetor, juntamente com as viagens e migrações, têm fornecido condições para novas epidemias em uma população suscetível ao vírus (Guzman & Istúriz, 2010; Gubler, 2011).



**Figura 1.1: Presença da dengue no mundo em 2014** (Modificado de Guzman & Harris, 2015).

Estima-se que ocorre um total de 40 milhões de infecções por DENV anualmente nas Américas, sendo que dessas infecções 13 milhões são aparentes (Bhatt *et al.*, 2013). Na década de 70, os quatro sorotipos de DENV existentes co-circulavam somente no sudeste asiático. Hoje, todos os sorotipos já foram detectados circulando por toda faixa intertropical mundial (WHO, 2009; Gubler, 2011).

### 1.1.2. No Brasil

Há registros desde 1846 de casos de dengue e/ou de síndromes comparáveis à dengue em diferentes estados do Brasil (Figueiredo, 2000; Reis, 1896; Pinheiro & Corber, 1997). O Brasil se destaca nas Américas contribuindo com mais de 60% dos casos de dengue desde a década de 80, após a reinfestação pelo *Aedes aegypti* (Halstead, 2007; San Martín *et al.*, 2010). A primeira epidemia a ser documentada foi na cidade de Boa Vista, Roraima, com os sorotipos DENV1 e DENV4 nos anos de 1981 e 1982 (Osanai *et al.*, 1983; Nogueira *et al.*, 2007). Os sorotipos 1, 2 e 3 foram introduzidos no Estado do Rio de Janeiro em 1986, 1990 e 2000, respectivamente (Schatzmayr *et al.*, 1986; Nogueira *et al.*, 1990; 2007; San Martín *et al.*, 2010)

Em 2007 e 2008, o DENV2 voltou a causar no RJ o maior número de casos fatais da doença (San Martín *et al.*, 2010). O último sorotipo a ser reintroduzido no Brasil foi o DENV4 no Estado de Roraima e no Amazonas em 2010, sendo detectado no Pará e em

Niterói (RJ) em 2011, havendo relatos de dengue grave e óbitos (SVS, 2011; Nogueira & Eppinghaus, 2011).

O panorama atual da dengue no Brasil mudou com a circulação dos quatro sorotipos virais (SVS, 2015a). A partir de 2007, passou a ocorrer um aumento do número de casos graves da doença em indivíduos de até 15 anos, ao invés de acometer principalmente os adultos na faixa etária de 20 a 40 anos como nas epidemias anteriores (Teixeira *et al*, 2013). Isto se deve ao fato dos indivíduos mais velhos terem acumulado imunidade contra os sorotipos circulantes (Rodriguez-Barraquer *et al*, 2011).

Nos três primeiros meses de 2015 foram registrados 368.247 casos notificados de dengue no país, com 183 casos graves e 2.150 com sinais de alerta. Somente na região sudeste foi relatado 66% do total de casos de dengue, 125 relatos de dengue grave e 1.798 com sinais de alarme. O estado de São Paulo se destacou por apresentar 100 casos graves da doença e 1.688 com sinais de alarme (SVS, 2015b).

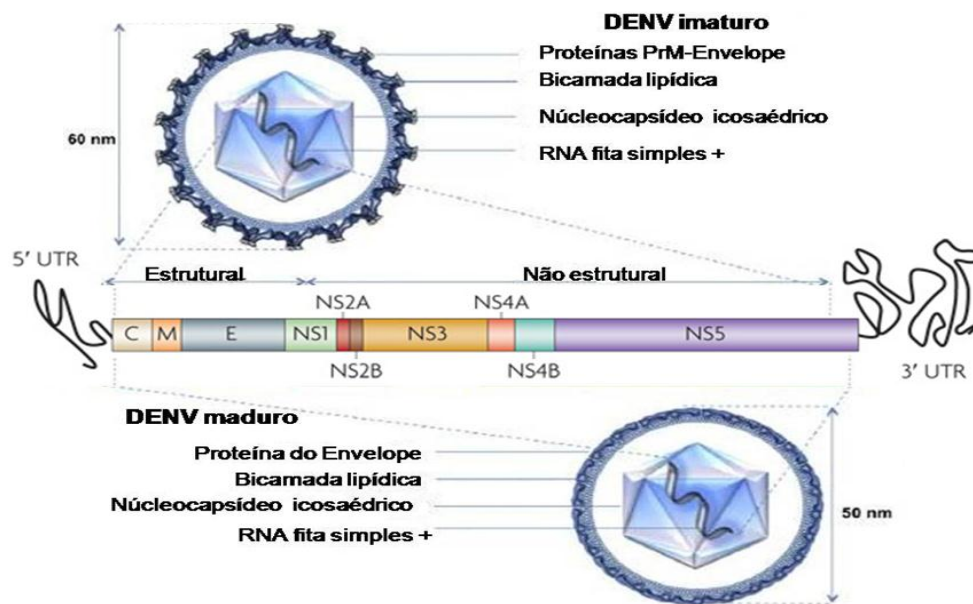
## **1.2. O vírus da dengue e o ciclo replicativo**

O vírus da dengue é um arbovírus que pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* (Henchal & Putnak, 1990). O DENV pode ser classificado em quatro sorotipos distintos que são geneticamente e antigenicamente relacionados entre si (DENV1, 2, 3 e 4).

O DENV possui um genoma de RNA com aproximadamente 10.700 nucleotídeos em fita simples e polaridade positiva, apresentando um único quadro de leitura aberta (*open reading frame*, ORF). O genoma codifica uma poliproteína precursora que compreende as três proteínas estruturais: a proteína do envelope, precursora de membrana e do capsídeo (E, prM e C, respectivamente) e as sete proteínas não-estruturais: proteína não estrutural 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B e 5 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, respectivamente), que são expressas apenas nas células infectadas (Figura 1.2) (Guzman *et al.*, 2010). O RNA viral é flanqueado por duas regiões não traduzidas, a 5' e a 3' UTR (untranslated regions), importantes para a tradução e replicação viral (Figura 1.2). A região 5'UTR contém a estrutura cap, onde ocorre o início da tradução, além de servir como promotor para a replicação do RNA viral. Ao contrário de outros Flavivírus, a região 3'UTR do RNA do

DENV não possui uma cauda poli-A (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2008; Bäck & Lundkvist, 2013).

Os vírus maduros possuem um diâmetro de aproximadamente 50 nm e são compostos por um envelope de bicamada lipídica que contém duas das proteínas estruturais virais, a proteína E e M (Henchal & Putnak, 1990). Abaixo deste envelope há um nucleocapsídeo, cuja forma icosaédrica com aproximadamente 30nm de diâmetro é composta por múltiplas cópias da proteína estrutural C, conjugada ao genoma viral (Figura 1.2). (Kuhn *et al.*, 2002; Smit *et al.*, 2011; Guzman & Harris, 2015).



**Figura 1.2:** Representação esquemática do genoma de RNA de fita simples do vírus da dengue e da conformação madura e imatura da partícula viral (Modificado de Guzman *et al.*, 2010 e de Herrero *et al.*, 2013).

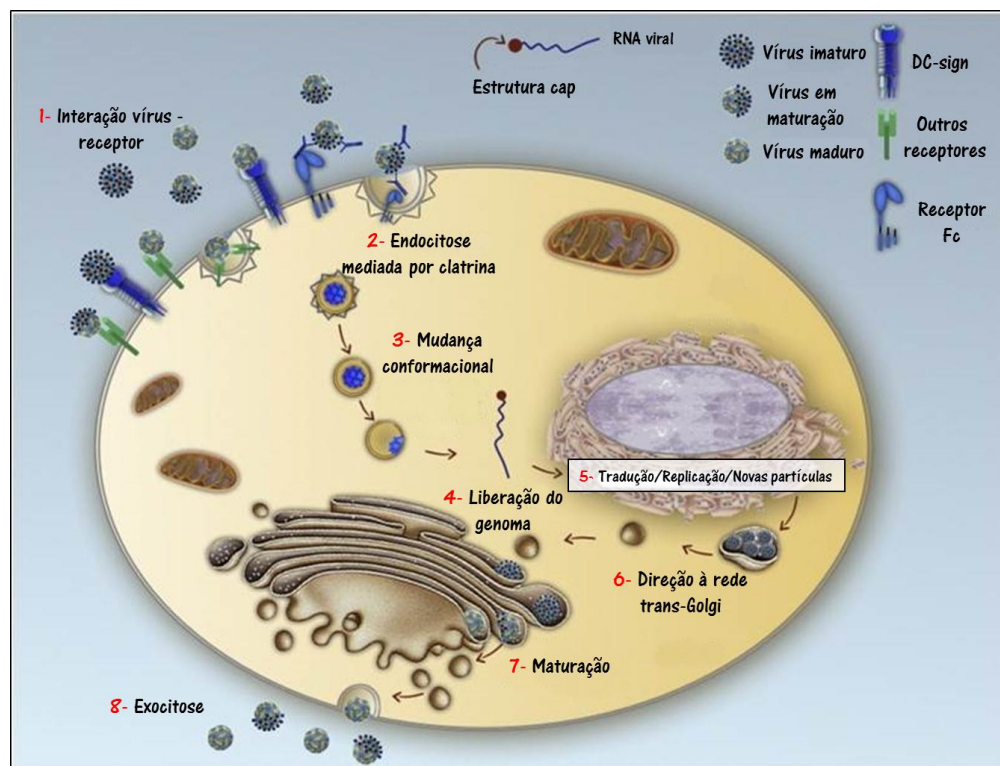
A partícula viral do DENV infecta a célula hospedeira através da endocitose dependente de clatrina ou da endocitose não clássica, independente de clatrina, ambas mediadas por receptores celulares (Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). A via de internalização do DENV pode depender de determinantes como o tipo da célula hospedeira, o sorotipo e a cepa do vírus infectante (Krishnan *et al.*, 2007; Van der Schaar *et al.*, 2008). A presença de antígeno do DENV em diversos órgãos e tipos celulares sugere que os receptores celulares que permitem a entrada do vírus na célula são amplamente distribuídos pelo hospedeiro.



Alguns receptores como os de ligação à manose (MR), o heparan sulfato (HS), a molécula de adesão de células dendríticas (DC-SIGN) e seu homólogo, L-SIGN, expresso em células endoteliais, proteínas de choque térmico 70 (HSP70) e 90 (HSP90), chaperonina GRP78/BiP, o receptor de lipopolisacarídeo CD14, o receptor de 37/67-kDa de alta afinidade pela laminina e receptores transmembranas TIM e TAM são candidatos a participarem desse processo (Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). Além disso, o vírus pode infectar as células alvo através da ligação à anticorpos gerados em uma infecção prévia por um sorotipo heterólogo do DENV, em um processo denominado aumento da replicação viral dependente de anticorpos (ADE, do inglês *antibody dependant enhancement*). Estes anticorpos se complexam ao vírus, mas não são capazes de neutralizar a partícula viral, ao contrário, facilitam a entrada da partícula na célula via receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) (Green *et al.*, 2014).

O processo de endocitose da partícula viral pode ocorrer através da interação do homodímero da proteína estrutural E com o receptor de ligação da superfície celular. Após a internalização do DENV, o pH ácido do endossomo leva à uma mudança conformacional na proteína E, que passa do estado dimérico para o trimérico, fazendo-a expor seu peptídeo de fusão que permite a fusão entre as membranas do envelope viral e do endossomo. Devido a isso, o nucleocapsídeo vai para o citoplasma onde ocorre a liberação do genoma viral para ser traduzido em uma única poliproteína, que é clivada por proteínas viral e celulares nas proteínas estruturais e não estruturais (Figura 1.3). Posterior a esta etapa de tradução, as proteínas não estruturais se associam com a região 3'UTR do RNA viral e formam um complexo replicativo, que promove a síntese da fita simples de RNA com polaridade negativa à partir do genoma de RNA com polaridade positiva (Natarajan, 2010). Esta fita de RNA negativa serve como fita molde para novas fitas de RNA positivas que farão parte das novas partículas virais a serem montadas. Atualmente, sabe-se que a infecção por DENV pode iniciar o processo de autofagia celular, que induz a formação de vesículas lipídicas no citoplasma da célula infectada, servindo como sítios de replicação do RNA viral onde se acumulam os complexos de replicação, constituídos por proteínas virais não estruturais (Figura 1.3) (Bäck & Lundkvist, 2013; Green *et al.*, 2014). No retículo endoplasmático (RE), a nova fita positiva de RNA é empacotada juntamente à proteína C dentro do envelope lipídico, coberto por heterodímeros de proteínas prM e E. Os novos

vírions formados são conduzidos através de vesículas do RE até o complexo de Golgi, onde o pH levemente ácido (~5.8-6.0) induz a dissociação dos dímeros prM/E (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Essa reorganização das proteínas prM e E possibilita que uma protease da célula hospedeira, a furina, clive a proteína prM gerando a proteína M. A dissociação do peptídeo pr da proteína M resulta na formação de partículas virais maduras que são liberadas para fora da célula por exocitose (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Essas partículas maduras recém-liberadas são estruturalmente diferenciadas da sua forma imatura e tornam-se aptas a infectarem outras células do hospedeiro, iniciando um novo ciclo de replicação viral (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Ciclo replicativo do vírus do dengue (1) O vírus DENV interage diretamente com receptores na superfície da célula alvo ou indiretamente com os receptores Fc $\gamma$ , quando complexado com anticorpos sub- ou não-neutralizantes oriundos de infecções passadas. (2) A partícula é internalizada, por endocitose, em uma vesícula mediante um mecanismo envolvendo clatrin, (3) dentro da qual ocorre alteração de pH levando a fusão das membranas viral e celular e a (4) consequente liberação do genoma viral para o citosol. (5) A replicação do genoma viral e a montagem de novas partículas ocorrem no retículo endoplasmático e (6) posteriormente os vírions formados são direcionados para a rede trans-Golgi. (7) No complexo de Golgi a furina, uma protease celular, cliva a prM em M originando partículas maduras ou parcialmente maduras, (8) que são exocitadas e podem infectar outras células (Modificado de Green *et al.*, 2014).

### **1.3. Proteínas Virais**

#### **1.3.1. Proteínas estruturais**

No envelope viral há a glicoproteína E (53kDa) que possui 3 domínios que participam na interação das partículas virais com receptores celulares, auxiliando na endocitose da partícula viral, no tropismo e na fusão com membranas celulares (Chambers *et al.*, 1990, Lindenbach & Rice, 2001). Além disso, a proteína E contém os principais epítomos que são reconhecidos por anticorpos neutralizantes, sendo assim um forte imunógeno (Lindenbach & Rice, 2001; Stiasny & Heinz, 2006).

Também no envelope, a proteína M possui um tamanho pequeno (8kDa) se comparado ao seu precursor proteico, a proteína prM (21kDa) (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Esta proteína precursora atua como uma chaperonina, estabilizando o domínio II da proteína E durante a passagem da partícula viral pelo Golgi, prevenindo que ocorra alguma fusão precoce de membranas (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Cruz-Oliveira *et al.*, 2014).

O nucleocapsídeo é formado pela proteína C, que é um homodímero de 11 kDa , cuja região central possui um sítio hidrofóbico que seria responsável por interagir com a membrana lipídica de vesículas, permitindo a montagem do nucleocapsídeo (Lindenbach & Rice, 2001). Esta interação membranotrópica da proteína C projeta uma região C-terminal com carga positiva que interage com a fita do RNA viral (Cruz-Oliveira *et al.*, 2014) e seria capaz de penetrar membranas durante a endocitose, tendo participação ativa na translocação o RNA do DENV para o citoplasma da célula infectada (Cruz- Oliveira *et al.*, 2014; Freire *et al.*, 2015).

#### **1.3.2. Proteínas não estruturais:**

A glicoproteína NS1 contém cerca de 46-55 kDa e pode ser encontrada na forma de monômero e/ou em homodímeros e hexâmeros. Após a tradução do genoma viral na célula infectada, a NS1 é translocada para o lúmen do RE devido a uma sequência sinal na região C-terminal da proteína E (Muller & Young, 2013). Através do RE e da via secretória do complexo de Golgi, a NS1 monomérica e hidrofílica é N-glicosilada em dois sítios conservados e, a seguir, se dimeriza. O dímero NS1 adquire uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) no RE (NS1-GPI), devido ao reconhecimento de uma sequência

sinal presente na região N-terminal da NS2A, que permite que ela se ligue à membrana celular (Costa *et al.*, 2007).

A NS1 é a única proteína viral a ser secretada para o meio extracelular, sendo liberada em maior parte na forma de hexâmeros (sNS1) (Chambers *et al.*, 1990; Bäck & Lundkvist, 2013). Durante o tráfego no RE e no complexo de Golgi, as unidades de dímeros se associam em trímeros para formarem hexâmeros solúveis (sNS1), que são secretados da célula. A sNS1, encontrada na circulação sanguínea, é uma molécula complexada à lipídeos, em que a junção dos três homodímeros resultam em uma estrutura em formato de barril com um orifício hidrofóbico no meio que permite a ligação com moléculas lipídicas (Gutsche *et al.*, 2011; Akey *et al.*, 2015). Como a NS1 é um dos focos desta dissertação, ela será descrita com mais detalhes no tópico 1.3.2.1.

A NS2A (22kDa) é uma proteína hidrofóbica que faz parte do complexo de replicação do RNA viral, sendo também requisitada durante a montagem de novos virions (McLean *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2013). Durante a montagem da partícula do DENV a NS2A interage com a proteína NS3 e desempenha um papel na incorporação de RNA às partículas nascentes (Kümmerer & Rice, 2002).

Já a NS2B é uma proteína que atua como co-fator para a atividade de protease atribuída à proteína NS3 (Natarajan, 2010).

A proteína NS3 funciona como uma serina-protease na sua porção N-terminal, dependente da NS2B, e também possui outras três atividades: de helicase, nucleotídeo trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase (RTPase) na sua porção C-terminal (Assenberg *et al.*, 2009). A NS3 aparentemente também está envolvida na montagem da partícula viral (Natarajan, 2010) e participa na regulação viral do metabolismo lipídico celular, através do recrutamento da proteína sintase de ácidos graxos (FASN) (Green *et al.*, 2014). Este processo aumenta a biossíntese de ácidos graxos favorecendo o aumento da replicação viral na célula infectada.

A NS4A é uma proteína transmembrana do RE altamente hidrofóbica (16kDa) e parece participar na indução da resposta a proteínas malformadas (UPR- do inglês *unfolded protein response*), com o intuito de proteger a célula da morte celular pelo estresse de retículo endoplasmático durante a replicação viral (McLean *et al.*, 2011; Guzman & Harris,

2015). Esta proteína também parece induzir rearranjos de membrana levando à formação do complexo replicativo (Nemésio *et al.*, 2012).

A proteína NS4B (27kDa) é caracterizada como uma proteína integral de membrana do RE devido a sua hidrofobicidade. Ensaio *in vitro* sugerem que a NS4B seja um componente do complexo de replicação viral, que interage com o domínio helicase proteína NS3 para dissociá-lo do RNA dupla fita (dsRNA), resultando no aumento da atividade global de separação do dsRNA durante a replicação (Umareddy *et al.*, 2006).

A NS5 (104 kDa) é a proteína mais conservada entre os flavivírus, cuja função de polimerase viral se encontra na região C-terminal e de metiltransferase na região N-terminal (Natarajan, 2010). A atividade RNA polimerase dependente de RNA é responsável pela síntese das fitas negativas e positivas do RNA viral (Potisophon *et al.*, 2014).

A atuação das proteínas não estruturais também inclui a interferência na resposta antiviral da célula infectada. A NS2A, o complexo NS2B-NS3, a NS4A, NS4B e a NS5 têm um papel de bloquear de alguma forma a via de sinalização do interferon, facilitando a replicação do vírus (Ashour *et al.*, 2009; Julander *et al.*, 2011; Nemésio *et al.*, 2012; Bäck & Lundkvist, 2013; Green *et al.*, 2014; Guzman & Harris, 2015; Xie *et al.*, 2015).

### **1.3.2.1. Proteína NS1:**

O papel da NS1 ainda não foi completamente elucidado, embora haja evidências da sua participação no complexo replicativo e da modulação do sistema antiviral em resposta ao RNA dupla fita (dsRNA) presente no momento da replicação (Muller & Young, 2013). Já houve relato da detecção da NS1 em compartimentos vesiculares junto ao dsRNA no citoplasma, onde a proteína possivelmente interage com a NS4A, demonstrando uma relevante participação no complexo replicativo (Mackenzie *et al.*, 1996; Muller & Young, 2013). Além disso, ensaios de mutagênese indicaram que a NS1 tem fundamental importância no início da replicação, no qual sem ela o vírus não se propaga. Outra função descrita é a de que este antígeno, tanto aderido à membrana celular quanto secretado, interage com vários componentes da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro que podem contribuir para a evasão do vírus frente a essa resposta ou para a patogênese da dengue (Akey *et al.*, 2015). Um exemplo disso, é a similaridade de um domínio específico

da NS1 com um sensor de RNA, que sugere um envolvimento direto dessa proteína na atenuação da resposta antiviral por interferir na detecção do dsRNA (Akey et al., 2015). Outros relatos indicam que a NS1 pode interagir com elementos do complemento antagonizando a sua ativação e, dessa forma, protegendo o vírus (Avirutnan *et al.*, 2010). Alguns autores sugerem que a integridade vascular pode ser alterada tanto por anticorpos anti-NS1, que interagem com proteínas do próprio organismo, quanto pela própria NS1 liberada por células infectadas, ocorrendo ativação do sistema do complemento que ocasiona a destruição de células infectadas (Muller & Young, 2013; Guzman & Harris, 2015).

Por outro lado, diversos trabalhos indicam que a proteína NS1 é um antígeno promissor para o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue, por ser capaz de induzir uma forte resposta humoral durante a infecção viral (Schlesinger *et al.*, 1987, 1993; Henchal *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2013). Adicionalmente, vários estudos demonstram um papel protetor de protótipos vacinais baseados nessa proteína em camundongos (Falgout *et al.*, 1990; Wu et al., 2003; Costa *et al.*, 2006 a e b; Costa *et al.*, 2007; Beatty *et al.*, 2015), com a participação da resposta imune tanto humoral quanto celular (Gonçalves, 2013).

#### **1.4. A doença**

Durante a picada, o mosquito inocula o vírus no hospedeiro e aparentemente a primeira replicação viral ocorre nas células de Langerhans (dendríticas subdermais). Uma vez que estas células são infectadas, elas tornam-se ativadas e migram para os linfonodos. A partir desse momento, a linhagem de monócito-macrófago parece ser infectada em seguida no linfonodo (Bäck & Lundkvist, 2013). Mais tarde, acredita-se que os monócitos circulantes são infectados devido à viremia, disseminando posteriormente o vírus para os demais órgãos. Alguns relatos demonstraram a presença de DENV em hepatócitos, pneumócitos, células endoteliais, musculares cardíacas e neuronais, tanto em casos fatais da doença quanto em modelos experimentais (Miagostovich *et al.*, 1997; Jessie *et al.*, 2004; Clyde *et al.*, 2006; Balsitis *et al.*, 2009; Paes *et al.*, 2009; Bäck & Lundkvist, 2013; Póvoa *et al.*, 2014)

Após a picada do mosquito no homem com qualquer um dos quatro sorotipos do DENV, há um período de incubação que dura em média de 4 a 7 dias, após o qual a infecção gera uma doença febril aguda com manifestações clínicas de amplo espectro, tradicionalmente classificadas: febre do dengue (FD), febre do dengue hemorrágica (FHD) e a síndrome do choque do dengue (SCD) (WHO, 1997; Edelman & Hombach, 2008). Vale ressaltar que a maioria dos casos de dengue são assintomáticos e apesar do indivíduo não apresentar sintomatologia, ele pode ser um reservatório do vírus. Além disso, a forma sintomática pode ser de difícil diagnóstico, com sintomas que se confundem com as de outras viroses, apresentando-se como uma febre indiferenciada (Monath, 1994; Ling et.al, 2007; Ross, 2010).

A FD se caracteriza pelo aparecimento repentino de febre acompanhada por sinais não-específicos, como: dor de cabeça, dor retro-orbital, fotofobia, bradicardia, mialgia, artralgia, fraqueza, leucopenia, náuseas, vômitos, erupção cutânea e manifestações hemorrágicas (Srikiatkachorn, 2009). Em contrapartida, os pacientes que desenvolvem FHD apresentam febre, ocasionalmente bifásica, fragilidade capilar, geralmente mostrada pelo teste positivo do torniquete, petéquias, equimoses, hematoma, sangramento da mucosa e do trato gastrointestinal. Além disso, no hemograma observa-se trombocitopenia e hemoconcentração, que indica o extravasamento de plasma devido ao aumento da permeabilidade vascular (Gubler, 1998; Narvaez *et al.*, 2011). Se o extravasamento de plasma não tiver uma espontânea e rápida resolução, pode causar a hipotensão que caracteriza a SCD e, a partir disso, pode ser secundariamente desenvolvida a insuficiência hepática e encefalopatia (Srikiatkachorn, 2009). Frequentemente há relatos de dor abdominal um pouco antes do doente entrar em choque (Gubler, 1998).

Quando ocorre a infecção de um indivíduo não é possível prever se o mesmo desenvolverá formas mais leves da doença ou evoluirá para as mais graves (FHD/SCD). Isto ocorre devido à complexidade dos mecanismos imunopatogênicos envolvidos e da interferência de fatores associados à idade, estado imunológico e nutricional, presença de doenças crônicas a constituição genética do hospedeiro. Além disso, a cepa e sorotipo viral podem influenciar a variação da intensidade das manifestações da dengue (Rothman, 2004; Whitehorn & Simmons, 2011; Simmons *et al.*, 2012).

Frente à complexidade de distinguir pela classificação tradicional um paciente com DHF e DF durante a fase aguda da dengue, a OMS em 2009 revisou a classificação devido a presença de uma variedade de sinais e sintomas não-específicos da doença (Gubler, 1998). Na nova classificação a doença é dividida em dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme e dengue grave (tabela 1.1) (Narvaez *et al.*, 2011). Essa classificação mais recente preconiza a presença de pelo menos um critério para haver uma associação com a gravidade da doença (Narvaez *et al.*, 2011)

<b>Classificação revisada da gravidade da dengue segundo a OMS em 2009</b>
<b>Dengue sem sinais de alerta:</b> febre com dois dos sintomas abaixo
- náusea, vômito
- rash
- dores (exemplo: retro-orbital, cefaleia e muscular)
-leucopenia
- teste do torniquete positivo
<b>Dengue com sinais de alerta:</b> a definição acima com um dos sintomas abaixo
- dor abdominal
- vômito persistente
- acúmulo de fluídos clínicos
- sangramento de mucosas
- letargia, prostração
- hepatomegalia
- aumento de hematócrito com uma queda rápida da contagem de plaquetas
<b>Dengue grave:</b> pelo menos um dos parâmetros abaixo:
- <b>extravasamento de plasma levando a:</b> SCD, acúmulo de fluídos associados à dificuldade respiratória.
- <b>Sangramento grave</b>
- <b>Comprometimento grave de órgãos:</b>
- grande aumento dos níveis das enzimas hepáticas: AST ou ALT > 1000 U
- alterações de consciência, falha cardíaca e de outros órgãos.

**Tabela 1.1:** Classificação revisada da gravidade da dengue segundo a OMS (adaptado de Narvaez *et al.*, 2011).

### 1.5. Patogênese:

A patogênese da dengue ainda não é bem compreendida, já que a progressão da doença parece ter causa multifatorial (Martina *et al.*, 2009). Algumas teorias são sugeridas para explicar a patogênese da dengue e a resposta imune do hospedeiro parece ser em muitas circunstâncias responsável pelos casos graves da doença. Um exemplo disso é o fato de que em uma infecção secundária, a fase crítica da doença ocorre quando há a diminuição



da carga viral, sugerindo que mecanismos imunológicos como a resposta imune adaptativa, os mediadores inflamatórios e os fenômenos de auto-imunidade são importantes no desenvolvimento da patogênese da dengue, mesmo sem a presença de viremia (Wan et al., 2013).

Outra hipótese está relacionada com a variação genética e antigênica das diferentes cepas virais, em que o genótipo e o sorotipo da cepa parecem se relacionar com o nível de gravidade da doença durante a infecção primária, sendo algumas cepas consideradas mais virulentas do que outras (Seneviratne *et al.*, 2006). Além disso, o tropismo celular e tissular de certas cepas virais pode também estar ligado ao agravamento da doença. Em necrópsias de casos fatais e em modelos experimentais, antígenos de DENV e a replicação viral têm sido detectados em diversos órgãos tais como baço, fígado, linfonodos, rim, coração, pulmão, timo, medula óssea e cérebro (Burke, 1968; Rosen *et al.*, 1999; Sariol *et al.*, 1999; Jessie *et al.*, 2004; Martina *et al.*, 2009; Paes *et al.*, 2009; Salgado *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014).

O comprometimento desses órgãos durante a infecção da dengue é um dos pontos da patogênese ainda pouco compreendido por ser até então considerado atípico (Gulati & Maheshwari, 2007). Além disso, os efeitos histopatológicos ocasionados pela infecção nesses órgãos também podem ser atribuídos a uma resposta imune desregulada do hospedeiro, em função da ativação de linfócitos T com efeito citotóxico e/ou a produção de citocinas pró-inflamatórias que causariam danos ao tecido (Guabiraba & Ryffel, 2014; Pagliari *et al.*, 2014).

Em infecções de dengue é comum encontrar descrições relacionadas aos danos no fígado, datadas desde meados de 1950 (Havens *et al.*, 1954; Bhamarapravati *et al.*, 1967; Burke, 1968; Ishak *et al.*, 1982; Mourão *et al.*, 2004; Trung *et al.*, 2010; Póvoa *et al.*, 2014). Sendo assim, o fígado é apontado como um dos órgãos alvo da doença, que leva ao seu mau funcionamento e a danos no tecido (Couvelard *et al.*, 1999; Huerre *et al.*, 2001; Rosen *et al.*, 1999; Jessie *et al.*, 2004; Paes *et al.*, 2005, 2009; Ling *et al.*, 2007). Além disso, antígenos virais e o RNA de DENV já foram detectados em células de Kupffer, hepatócitos e células endoteliais no fígado, tanto de humanos como de camundongos (Couvelard *et al.*, 1999; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Paes *et al.*, 2005, 2009;

Seneviratne *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008; Smith & Khakpoor, 2009; Póvoa *et al.*, 2014). Dentre as mudanças histopatológicas observadas em casos fatais da doença estão: esteatose, tumefação seguida de degeneração vacuolar baloniforme, necrose hepatocitária, hemorragia, edema, hiperplasia de célula de Kupffer e infiltrados no espaço porta (Couvelard *et al.*, 1999; Huerre, 2001; Basilio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Seneviratne *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2007; Póvoa *et al.*, 2014). Uma das consequências dos danos no tecido hepático é o aumento dos níveis séricos das enzimas alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), que têm maior significância em casos de FHD/SCD do que em FD (Kuo *et al.*, 1992; Souza *et al.*, 2004; Seneviratne *et al.*, 2006; de Souza *et al.*, 2007).

Em relação ao tecido pulmonar, poucos estudos abordam as alterações encontradas em casos humanos, sendo os principais relatos macroscópicos a hemoptise, derrame pleural, hemorragia e edema (Marchiori *et al.*, 2012; Póvoa *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2014). Além disso, alguns estudos já mostraram a replicação do DENV através da detecção de antígenos virais e da fita negativa de seu RNA no pulmão, em macrófagos alveolares, células endoteliais (Jessie *et al.*, 2004, Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Balsitis *et al.*, 2009) e recentemente nosso grupo também observou sua presença em pneumócitos tipo II (Póvoa *et al.*, 2014). As alterações morfológicas destes tecidos incluem áreas extensas de hemorragia e edema, congestão de septo alveolar, ruptura focal da parede do septo e seu espessamento, presença de infiltrados mononucleares, hiperplasia de macrófagos alveolares e hipertrofia de pneumócitos tipo II (Bhamarapravati *et al.*, 1967; Setlik *et al.*, 2004; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2014; Póvoa *et al.*, 2014).

Classicamente o DENV vem sendo caracterizado como um vírus não neurotrópico, apesar de desde 1990 haver um aumento dos relatos de casos de dengue com o envolvimento neurológico em áreas endêmicas do mundo. Somente em 2009 a OMS incorporou as manifestações neurológicas na classificação dos casos clínicos de dengue grave (Carod-Artal *et al.*, 2013; Malhotra & Garg, 2014). As complicações neurológicas da infecção pelo DENV podem ser caracterizadas como encefalopatia, encefalite, síndromes imunomediadas (mielite aguda transversa, encefalomielite aguda disseminada e síndrome de Guillain-Barré), disfunção muscular e desordens neuro-oftálmicas. Em algumas autópsias são observadas alterações histopatológicas como edema, congestão vascular,

focos hemorrágicos e infiltrados linfocitários perivasculares, de acordo com a hipótese de neuroinvasão direta do vírus (Carod-Artal *et al.*, 2013). Junto a isso, tanto o vírus, a proteína NS1 e anticorpos específicos IgM foram encontrados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com dengue, assim como o vírus e seus antígenos vêm sendo detectados no tecido cerebral de casos fatais da doença (Chimelli *et al.*, 1990; Bhoopat *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1998; Nogueira *et al.*, 2005; Balsitis *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2012; Salazar *et al.*, 2013). Observações histopatológicas similares com detecção do vírus também foram relatadas em modelos murinos (Amaral *et al.*, 2011; Amorim *et al.*, 2012; Velandia-Romero *et al.*, 2012).

### **1.6. Resposta imune**

A patogênese da dengue engloba múltiplos fatores, sendo a resposta imune do hospedeiro um deles. Com relação a isso, estudos indicam que o risco da doença evoluir para uma DHF aumenta de 15 a 80 vezes no caso de uma infecção heteróloga, com cerca de 90% dos casos de DHF observados durante a infecção secundária com um sorotipo diferente da primária (Mathew & Rothman, 2008).

Uma das hipóteses levantadas para explicar os casos de agravamento da doença em uma segunda infecção é o fenômeno conhecido como aumento da replicação viral dependente de anticorpos ou ADE (Henchal & Putnak, 1990; Gluber, 1998; Green *et al.*, 1999; Rothman & Ennis, 1999; Rothman, 2004; Chen *et al.*, 2004; Kurane, 2007). Durante a primeira infecção com um dos sorotipos de DENV são gerados anticorpos que conferem proteção duradoura contra esse mesmo sorotipo, mas não contra um outro sorotipo (Mathew & Rothman, 2008). Ao contrário, estes anticorpos além de não serem capazes de neutralizar a partícula viral do sorotipo heterólogo facilitam a infecção de monócitos, macrófagos e células dendríticas, através da sua ligação aos receptores Fcγ presentes na superfície destas células (Mathew & Rothman, 2008).

Outra hipótese é a do “pecado antigênico original”, na qual as células T de memória geradas na infecção primária são ativadas preferencialmente em uma infecção secundária com outro sorotipo, por apresentarem reatividade cruzada contra epítomos altamente conservados (Rothman, 2004, 2011; Martina *et al.*, 2009; Kurane *et al.*, 2011). Tais células

apresentam baixa atividade citotóxica contra células infectadas com este segundo sorotipo e secretam altas quantidades de citocinas inflamatórias, levando aos quadros mais graves da doença.

Diversos estudos vêm demonstrando que os níveis de citocinas pro-inflamatórias se mostram bastante alterados na dengue, principalmente nos casos mais graves, em um fenômeno denominado tempestade de citocinas (do inglês, *cytokine storm*). Essas citocinas, como por exemplo TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , RANTES, entre outras, poderiam repercutir sobre o mau funcionamento do endotélio vascular, levando ao extravasamento plasmático que é visto como um dos principais aspectos da dengue grave (Grenn & Rothman 2006; Srikiatkachorn *et al*, 2007).

Outros trabalhos mostram que a ativação do complemento também é um fator importante na FHD (Nishioka *et al.*, 1974; Shaio *et al.*, 1992). Alguns estudos enfatizam que os altos níveis da proteína NS1 secretada pelas células infectadas e a presença de anticorpos contra essa proteína poderiam ser um motivo da ativação exacerbada do complemento (Lin *et al.*, 2008). Tais anticorpos reagiriam de forma cruzada com hepatócitos, células endoteliais e plaquetas, gerando um processo auto-imune (Falconar, 1997; Falconar, 2008; Liu *et al.*, 2011; Chang, *et al.*, 2001; Lin, *et al.*, 2002; Oishi, *et al.*; 2003, Sun, *et al.*, 2007). Entretanto, observou-se que a recuperação dos pacientes com extravasamento vascular não coincide com uma queda dos níveis de anticorpos anti-NS1 circulantes (Mairuhu *et al.*, 2004). Ao contrário, é durante o período de convalescência que os níveis de anticorpos anti-NS1 estão mais elevados (Muller & Young, 2013), o que não explicaria seu efeito patogênico. Adicionalmente, crianças com FHD/SCD em infecções primárias não apresentam níveis elevados de anticorpos anti-NS1 circulantes durante a fase aguda da doença (Muller & Young, 2013). Portanto a correlação da circulação de anticorpos anti-NS1 com a gravidade da dengue é bastante controversa e precisa ser melhor estudada. Por outro lado, já foi reportado que monócitos e células endoteliais infectadas ativam o complemento pelas vias clássica e alternativa. Dessa forma, a via do complemento pode ser ativada por diversos mecanismos, contribuindo para o extravasamento plasmático (Malasit *et al.*, 1987; Avirutnan *et al.*, 2006).

## 1.7. Vacinas contra a dengue em ensaio clínico:

Na atual conjuntura, somente as estratégias de controle do vetor não têm sido suficientes para a redução da transmissão do DENV. Por isso é prioridade de saúde pública o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra os quatro sorotipos do DENV (Vaughn *et al.*, 2000; Ghosh & Dar, 2015). Apesar dos esforços ao longo de décadas de pesquisa, ainda não há uma vacina contra a dengue licenciada para utilização em humanos, porém diversos protótipos vêm sendo testados em ensaios clínicos (Thisyakorn & Thisyakorn, 2014).

Uma das primeiras vacinas foi baseada na utilização de vírus atenuado por passagens sequenciais em cultura de célula. Inicialmente um grupo na Tailândia, da Universidade de Mahidol, avaliou uma formulação tetravalente em ensaios clínicos de fase I e II, mas os resultados não foram satisfatórios, com baixa soroconversão contra alguns vírus e fortes reações adversas (Thisyakorn & Thisyakorn, 2014). Posteriormente outra vacina foi desenvolvida nos EUA pelo Instituto Walter Reed de Pesquisas do Exército (WRAIR, *Walter Reed Army Institute of Research*) e licenciada pela GlaxoSmithKline (GSK) (Sabchareon *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003). Contudo, os resultados da triagem clínica de fase I desta vacina não foram satisfatórios, pois a taxa de soroconversão para o DENV4 foi baixa em comparação aos demais sorotipos (Ghosh & Dar, 2015). Posteriormente, os testes com uma nova formulação tetravalente tendo o DENV4 menos atenuado gerou melhores resultados, com uma segurança aceitável e imunogenicidade com mais de 60% de soroconversão (Ghosh & Dar, 2015). Entretanto, avaliações com um número maior de adultos e crianças ainda não se encontram disponíveis.

Também nos EUA, uma vacina viva atenuada por mutagênese sítio dirigida foi desenvolvida pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH, *National Institute for Health*) e está sendo produzida pelo Instituto Butantan no Brasil para ensaios clínicos. Este candidato vacinal foi atenuado por deleções de 30 nucleotídeos ( $\Delta 30$ ) na região não traduzida 3'-UTR para cada sorotipo do DENV (Durbin *et al.*, 2011). Posteriormente, foram construídos alguns vírus DEN $\Delta 30$  quiméricos, com a substituição dos genes prM/E de um sorotipo por outro (Durbin *et al.*, 2011). Nos ensaios clínicos de fase I a formulação tetravalente, a TetraVax-DV, composta pelos candidatos rDEN1 $\Delta 30$ , rDEN2/4 $\Delta 30$ , rDEN3/4 $\Delta 30$  e

rDEN4Δ30 induziu uma resposta balanceada de anticorpos, com soroconversão variada para os diferentes DENVs (Durbin *et al.*, 2011; Sinha, 2014). Entretanto, vale ressaltar que possíveis reversões ou recombinações gênicas encontradas em vacinas atenuadas podem gerar um risco de quadros graves da infecção por dengue (Barrett, 2001).

Os estudos de ensaios clínicos com a vacina CYD-TDV ou ChimeriVAX<sup>TM</sup>, produzida pela Sanofi Pasteur, são os mais adiantados e se baseiam na utilização de vírus quiméricos contendo os genes prM/E derivados de cada um dos quatro sorotipos de DENV contidos em um “esqueleto” do vírus vacinal contra a febre amarela (YFV-17D) (Guy *et al.*, 2010). Os ensaios clínicos de fase I e II com três doses da vacina, em intervalos de seis meses, em voluntários sadios mostraram soroconversão de 77-100% e produção de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos virais (Guy *et al.*, 2011; Morrison *et al.*, 2010). Entretanto, o ensaio clínico de fase IIb na Tailândia demonstrou que apesar das crianças apresentarem níveis elevados de anticorpos neutralizantes contra o DENV2 elas não ficaram protegidas contra este sorotipo (Sabchareon *et al.*, 2012). Tais resultados demonstraram a necessidade de mais estudos em relação às respostas imunes protetoras contra dengue. Apesar disso, esta vacina foi a única até o momento a ir para estudo de fase III em crianças na Ásia e América Latina, com eficácia de aproximadamente 60% e diminuição de mais de 80% do aparecimento das formas mais graves da dengue (Capeding *et al.*, 2014; Sinha, 2014; Wise, 2015). Apesar do relativo sucesso dessa vacina, ainda existem críticas em relação ao seu protocolo de imunização de longa duração, com restrições para regiões endêmicas, onde a imunização ineficiente no período entre as doses poderia aumentar os riscos do desenvolvimento de casos mais graves da doença (Murphy & Whitehead, 2011).

Outro exemplo de vacina quimérica tetravalente é a DENVax, que foi desenvolvida pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) e depois licenciada pela Inviragen nos EUA. Nesse caso, uma cepa atenuada de DENV2 por passagem em células de mamífero serviu como “esqueleto” carreador dos genes prM/E dos demais sorotipos em substituição dos genes correspondentes do DENV2 (Osorio, *et al.*, 2011). Nos ensaios pré-clínicos, a vacina tetravalente inoculada em duas doses revelou ser altamente segura e imunogênica (Ghosh & Dar, 2015). Os ensaios de fase I já terminaram, mas os resultados ainda não foram publicados.

Uma estratégia também adotada é a das vacinas inativadas por formalina, como a elaborado pelo WRAIR, cuja formulação monovalente mostrou ser segura, imunogênica e protetora em camundongos e macacos Rhesus (Ghosh & Dar, 2015). Esta vacina está sendo testada em ensaio clínico de fase I, em uma parceria entre o WRAIR e a GSK (Beaumier *et al.*, 2013; Ghosh & Dar, 2015).

Também existem estudos com vacinas de subunidades, geralmente baseadas na glicoproteína E e indução de anticorpos neutralizantes. Neste sentido, a Hawaii Biotech/Merck, desenvolveu um candidato vacinal que consiste na combinação de subunidades proteicas recombinantes contendo as proteínas prM inteira e 80% da E, derivadas de cada um dos quatro sorotipos virais e expressas em células de inseto (Coller *et al.*, 2011). Estas vacinas estão sendo testadas em ensaio de fase I com formulações monovalentes (WHO, 2014; Ghosh & Dar, 2015). Apesar de ser uma estratégia vacinal mais segura em relação às vacinas vivas atenuadas, são requeridas múltiplas doses com adjuvantes para indução de proteção (Murphy & Whitehead, 2011).

Outra abordagem promissora são as vacinas de DNA. Neste sentido, o Centro Naval de Pesquisas Médicas (*Naval Medical Research Center*) junto à Vical Inc., nos EUA, elaborou uma vacina tetravalente contendo plasmídeos que codificam os genes prM/E dos quatro sorotipos do DENV. Nos ensaios clínicos de fase I, foi testada a vacina de DNA monovalente anti-DENV1, entretanto os níveis de anticorpos neutralizantes gerados se mostraram baixos e com pouca soroconversão (Beckett *et al.*, 2011). Contudo, uma formulação tetravalente da vacina de DNA, a Vaxfectin, aplicada em macacos resultou em um aumento da imunogenicidade, fazendo-a progredir para os ensaios clínicos de fase I que mostrou que a vacina foi bem tolerada (Porter *et al.*, 2012). Como abordagem da vacina de DNA é um dos focos do nosso estudo, este assunto será detalhado a seguir no próximo item.

### **1.7.1. Vacinas de DNA:**

As vacinas de DNA são plasmídeos contendo um cassete de expressão em células eucarióticas que codifica uma ou mais proteínas de interesse no hospedeiro e possibilita a geração de antígenos *in vivo* (Gurunathan *et al.*, 2000<sup>a</sup>). O cassete de expressão é formado

geralmente por um promotor viral forte e constitutivo, o gene que codifica o antígeno de interesse, um códon de parada da tradução e uma sequência de poliadenilação (Poli A) (Gurunathan *et al.*, 2000b). Além disso, muitas vezes esses plasmídeos também possuem um gene de resistência a antibiótico que é controlado por um promotor procariótico e uma origem de replicação, no intuito de selecioná-los e amplificá-los em bactérias.

Após a inoculação das vacinas de DNA, geralmente por via intramuscular, subcutânea ou intradérmica, as células do hospedeiro são transfectadas e o DNA plasmidial vai para o núcleo, onde permanece na forma episomal e é transcrito. O RNA mensageiro segue então para o citoplasma onde são traduzidas múltiplas cópias da proteína alvo. Essas proteínas podem ser expressas no próprio citoplasma, na superfície das células ou liberadas para o meio extracelular, dependendo da presença ou não de sequências sinalizadoras inseridas no cassete de expressão (Costa *et al.*, 2007; Liu, 2011). Uma vantagem das vacinas de DNA parece ser mimetizar uma infecção viral natural, com a ativação dos dois braços da resposta imune, a humoral e a celular (Kutzler e Weiner, 2008). Além disso, a vacina de DNA é uma estratégia segura em comparação com as vacinas vivas atenuadas, que estão propensas à reversão para as formas virulentas (Liu, 2011).

Apesar das vacinas de DNA apresentarem uma boa eficácia e resposta imunológica de longa duração em camundongos, em macacos e humanos a sua imunogenicidade não foi tão boa (Davis *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2006a e b). Tal fato se deve provavelmente a baixa eficiência de transfecção em primatas, com injeções diretas das vacinas de DNA (Nardi *et al.*, 2002). Uma opção para melhorar esta transfecção *in vivo* é a inoculação do DNA plasmidial por eletroporação, cujos resultados em primatas não humanos e em ensaios clínicos com diferentes vacinas de DNA têm se mostrado bastante eficiente (Bodles-Brakhop *et al.*, 2009). Outra opção é a inclusão de sequências imunoestimuladoras nos plasmídeos vacinais, como os motivos CpG que atuam como adjuvante ativando o receptor Toll-like 9 (TLR-9), que estimula a resposta inata e adaptativa (Kumagai *et al.*, 2008). Além disso, alguns estudos utilizam imunizações concomitantes de plasmídeos que expressam citocinas pró-inflamatórias (Widera *et al.*, 2000; Ulmer *et al.*, 2006). Nesse mesmo intuito, uma estratégia alternativa é realizar uma imunização mista, na qual a vacina



de DNA faria parte de um esquema de dose-reforço (do inglês, *prime-boost*) junto com outras abordagens vacinais (Azevedo *et al.*, 2013).

## **1.8. Modelos animais experimentais para estudo da dengue**

A infecção com DENV não ocasiona o fenótipo da doença em animais como o observado nos humanos, o que gera uma barreira para se obter um modelo animal adequado para seu estudo (Yauch & Shresta 2008). No entanto, nas últimas décadas foram descritas várias tentativas em desenvolver modelos *in vivo* para o estudo da patogênese da dengue, fazendo uso da inoculação de amostras virais adaptadas ou não e também altas doses do vírus por diferentes vias de inoculação, tanto em camundongos como em macacos.

### **1.8.1. Primatas não-humanos (PNH):**

Antes dos ensaios clínicos, os PNH são usualmente escolhidos para testes finais de imunogenicidade, eficácia protetora e segurança de vacinas contra o vírus, por causa da sua proximidade evolutiva com os humanos. As características mais importantes do modelo de infecção com PNH são a detecção da viremia e de uma resposta de anticorpos neutralizantes similar a dos humanos, contudo geralmente nenhum sinal clínico da doença é detectado (Bente & Rico-Hesse, 2006; Yauch & Shresta, 2008). Apenas um estudo com macacos *rhesus*, inoculados com DENV por via subcutânea (s.c.), mostrou leucopenia após a infecção primária e trombocitopenia após uma infecção secundária com um sorotipo heterólogo do vírus (Halstead *et al.*, 1973). Esse mesmo grupo mostrou que os animais infectados desenvolvem uma viremia transiente de 3 a 6 dias e que durante esse período o vírus pode ser isolado de linfonodos distantes, da pele e eventualmente do pulmão, baço, timo, fígado e da medula óssea (Marchette *et al.*, 1973). Outro estudo, utilizando o modelo de macacos *rhesus* infectados com DENV pela via intravenosa (i.v), reportou sinais hemorrágicos e de coagulopatia após a infecção com DENV (Onlamoon *et al.*, 2010). Contudo, devido aos obstáculos de natureza financeira e ética esses animais não são utilizados nas etapas iniciais para testes de protótipos vacinais. (Bente & Rico-Hesse, 2006; Zompi & Harris, 2012; Guabiraba & Ryffel, 2013).

### **1.8.2. Camundongos imunocompetentes:**

Os modelos murinos imunocompetentes incluem os camundongos BALB/c e C57BL/6, que não apresentam nenhuma alteração no sistema imune e suportam um nível baixo de replicação viral (Zompi & Harris, 2012). Essas linhagens podem ser infectadas com altas doses do vírus não adaptado a camundongos pelas vias de inoculação i.v, intraperitoneal (i.p.), intradérmica (i.d.) ou s.c. Tais modelos foram capazes de induzir alguns efeitos da infecção similares aos observados em casos humanos de FD/FHD (Chen *et al.*, 2004, 2007; Paes *et al.*, 2005, 2006; Barth *et al.*, 2009; França *et al.*, 2010).

Sabe-se que os camundongos selvagens são geralmente resistentes à doença induzida pelo DENV (Zellweger & Shresta 2014). Em vista disso, abordagens como a utilização de amostras virais neuroadaptadas (obtidas por passagens em cérebro de camundongos neonatos) e inoculação com altas doses de DENV são utilizadas para o desenvolvimento de um modelo experimental para a dengue (Boonpucknavig *et al.*, 1981; Hotta *et al.*, 1981; An *et al.*, 1999; Shresta *et al.*, 2006; Bente & Rico-Hesse, 2006; Zompi & Harris, 2012; Guabiraba & Ryffel, 2013). Após a infecção de camundongos imunocompetentes com altas doses de DENV neuroadaptado foram observadas alterações como danos hepáticos, aumento dos níveis séricos de transaminases, sinais hemorrágicos, aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, alteração na permeabilidade vascular, leucocitose, trombocitopenia e aumento de hematócrito, levando em alguns casos à morte dos animais (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Guabiraba *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012; Zompi & Harris, 2012).

Já a inoculação por via i.c de vírus neuroadaptado induz sinais clínicos neurológicos, como a paralisia dos membros inferiores, e levam os animais a óbito (Zompi & Harris, 2012). Para os testes de imunogenicidade, segurança e eficácia de proteção dos protótipos vacinais contra DENV, esse modelo é amplamente utilizado, com análise de morbidade e mortalidade, embora pouco se saiba a respeito da sua patogênese (Kaufman *et al.*, 1987; Bray *et al.*, 1989; Falgout *et al.*, 1990; van Der Most *et al.*, 2000; Chambers *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2006; Yauch & Shresta 2008; De Paula *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2011; Zompi & Harris, 2012; Azevedo *et al.*, 2013; Back & Lundkvist, 2013).

### **1.8.3. Camundongos imunodeficientes:**

Animais imunodeficientes apresentam níveis variados de susceptibilidade à infecção com DENV. Camundongos A/J, que não possuem o componente C5 do sistema complemento, quando infectados com altas doses da cepa DENV2 PL046 apresentam viremia poucos dias após a infecção e trombocitopenia transiente em momentos mais tardios (Huang *et al.*, 2000). Camundongos AG129, bastante utilizados em estudos de DENV, não possuem os receptores de interferon (INF)  $\alpha/\beta$  e  $\gamma$ . O knockout destes genes mostrou que esse mediador da resposta imune apresenta uma importante atividade antiviral contra DENV, tornando os animais susceptíveis a baixas doses do vírus (Shresta *et al.*, 2004; Bente & Rico-Hesse, 2006; Balsitis *et al.*, 2010). A infecção com o vírus D2S10 (gerado por passagens alternativas do vírus PL046 em células de mosquito e de camundongo para mimetizar o ciclo de transmissão natural) demonstrou uma maior virulência, recapitulando parte das manifestações graves em humanos, como alterações de permeabilidade, trombocitopenia e morte, mediada pelo aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , em camundongos AG129 sem sinais de paralisia. (Johnson & Roehrig, 1999; Shresta *et al.*, 2006).

O camundongo AG129 tem sido usado para testes de proteção de vacinas contra DENV e para estudos relacionados ao ADE (Kyle *et al.*, 2008; Zompi & Harris, 2012; Brewoo *et al.*, 2012; Guabiraba & Ryffel, 2013; Smith *et al.*, 2014). Entretanto, há uma limitação deste modelo no que se refere à ausência de sinalização e produção do IFN pelos camundongos. Isso impossibilita em parte a análise da resposta imune celular do hospedeiro contra o DENV, comprometendo os estudos de resposta gerada por vacinas contra o vírus (Zellweger & Shresta 2014).

### **1.8.4. Camundongos humanizados:**

Os camundongos com imunodeficiência sereva combinada (SCID) não apresentam as respostas imune humoral e celular, atribuído à deficiência no desenvolvimento de células B e T, e podem ser enxertados com células de outra origem para melhorar o desempenho da infecção por DENV e reprodução da doença (Zompi & Harris, 2012). Apesar de o DENV infectar bem camundongos SCID enxertados com linhagens celulares humanas K562, Huh7

ou HepG2, sua replicação ocorre majoritariamente nas células tumorais enxertadas e posteriormente no cérebro dos camundongos (Yauch & Shresta, 2008; Smith *et al*, 2014). Devido a essas condições, esse modelo não é indicado para estudos relacionados à patologia da dengue, mas são úteis em testes de atenuação de vacinas vivas (Bäck & Lundkvist, 2013; Yauch & Shresta, 2014).

Outra abordagem é o uso de camundongos humanizados que recebem um enxerto de tecidos humanos, ao invés de células de linhagem tumoral (Yauch & Shresta, 2008). O enxerto com células humanas hematopoiéticas em camundongos SCID não é eficiente devido à presença da resposta imune inata nesses animais e por isso são utilizados animais diabéticos não-obesos NOD/SCID/IL2R $\gamma$ KO, cuja resposta humoral, hemolítica do complemento e das células NK, T e B são deficientes (Bente & Rico-Hesse, 2006). O enxerto de células humanas progenitoras CD34<sup>+</sup> nesses animais levou a permissividade da infecção com DENV em diferentes tecidos e o aparecimento de sinais da DHF (Guabiraba & Ryffel, 2013; Smith *et al*, 2014). Entretanto, este modelo vem sendo criticado por apresentar variabilidade sintomatológica dependendo da linhagem celular utilizada no enxerto. Outro ponto de discussão é em relação à deficiência severa do sistema imunológico nesses animais, que gera uma barreira para os estudos da patogênese em dengue e testes de vacinas (Yauch & Shresta, 2008).

Apesar dos vários modelos animais existentes não mimetizarem a doença como ocorre em humano, eles são úteis na busca de uma melhor compreensão sobre a patogênese da dengue (Zompi & Harris, 2012). Entretanto, a utilização de camundongos imunodeficientes pode levar a conclusões errôneas sobre a eficácia de drogas antivirais e vacinas, já que a resposta imune induzida nesses animais não é a mesma observada em animais imunocompetentes.

Nesse contexto, nosso grupo vem explorando um modelo experimental para estudos da dengue, utilizando uma amostra neuroadaptada de DENV2, cepa Nova Guiné (DENV2 NGC), com inoculações por via i.c. Os animais apresentam sinais clínicos da infecção (paralisia dos membros posteriores e comprometimento da coluna vertebral), sendo que a maioria vai a óbito. No presente estudo, observamos também alterações histopatológicas nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral/cerebelar. Caracterizamos com mais detalhes tais alterações, com detecção do antígeno NS3 em diferentes células, assim como da presença

do vírus no soro e no pulmão desses animais. Este modelo também foi utilizado para teste de uma vacina de DNA que expressa a proteína NS1 de DENV2 (Costa *et al.*, 2006, 2007), com análise dos mesmos parâmetros descritos acima.

Como grande parte dos nossos estudos se baseiam em análises histopatológicas destes órgãos, abordaremos no próximo item um pouco sobre a morfologia e fisiologia de tais órgãos.

## **1.9. Morfologia do tecido hepático, pulmonar e cerebral/cerebelar**

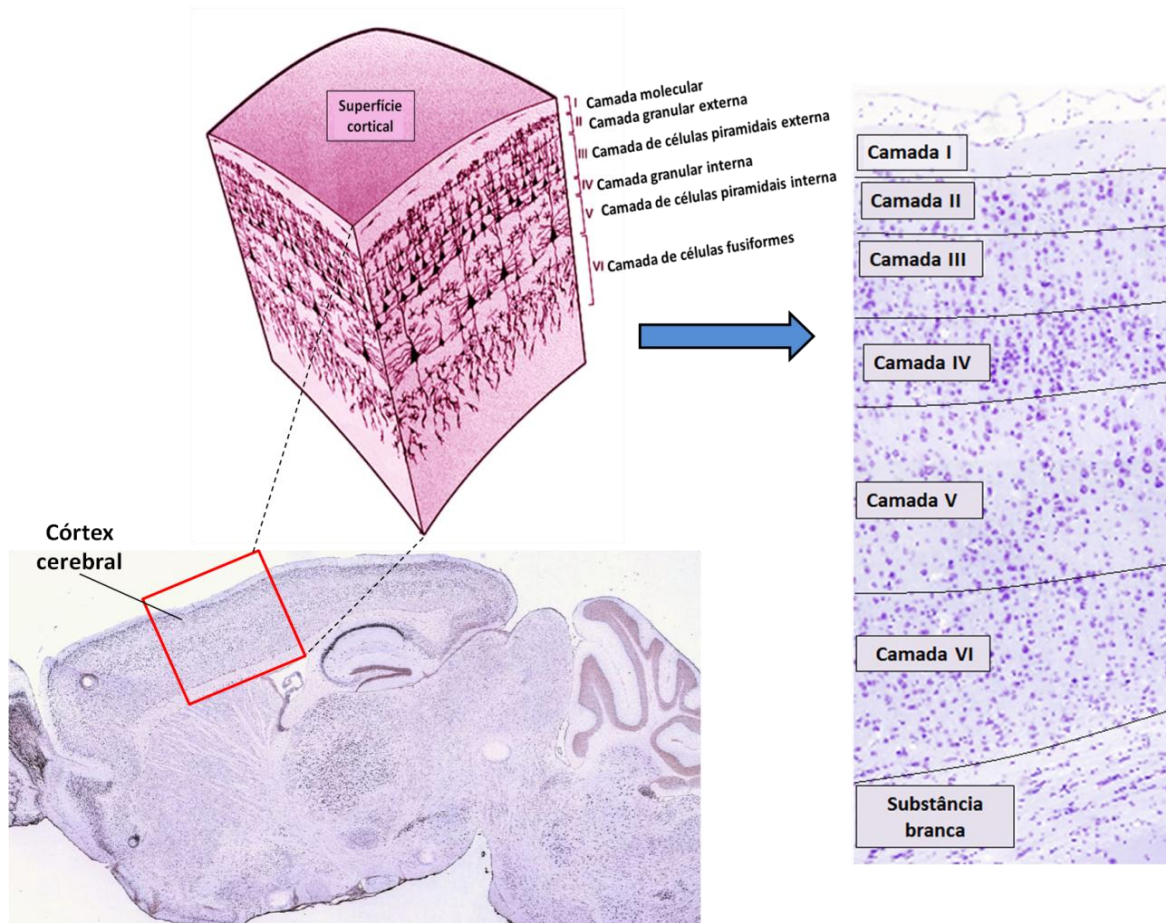
### **1.9.1. tecido cerebral/cerebelar:**

O sistema nervoso central (SNC) é constituído por células neuronais e neurogliais. As células da neuroglia são classificadas como: astrócitos, oligodendrócitos e microglia, que são células sustentadoras do tecido nervoso responsáveis pela regulação do transporte de substâncias do sangue em direção aos neurônios, produção de mielina dos axônios das células nervosas e função de macrófagos residentes, respectivamente (Junqueira & Carneiro, 2004).

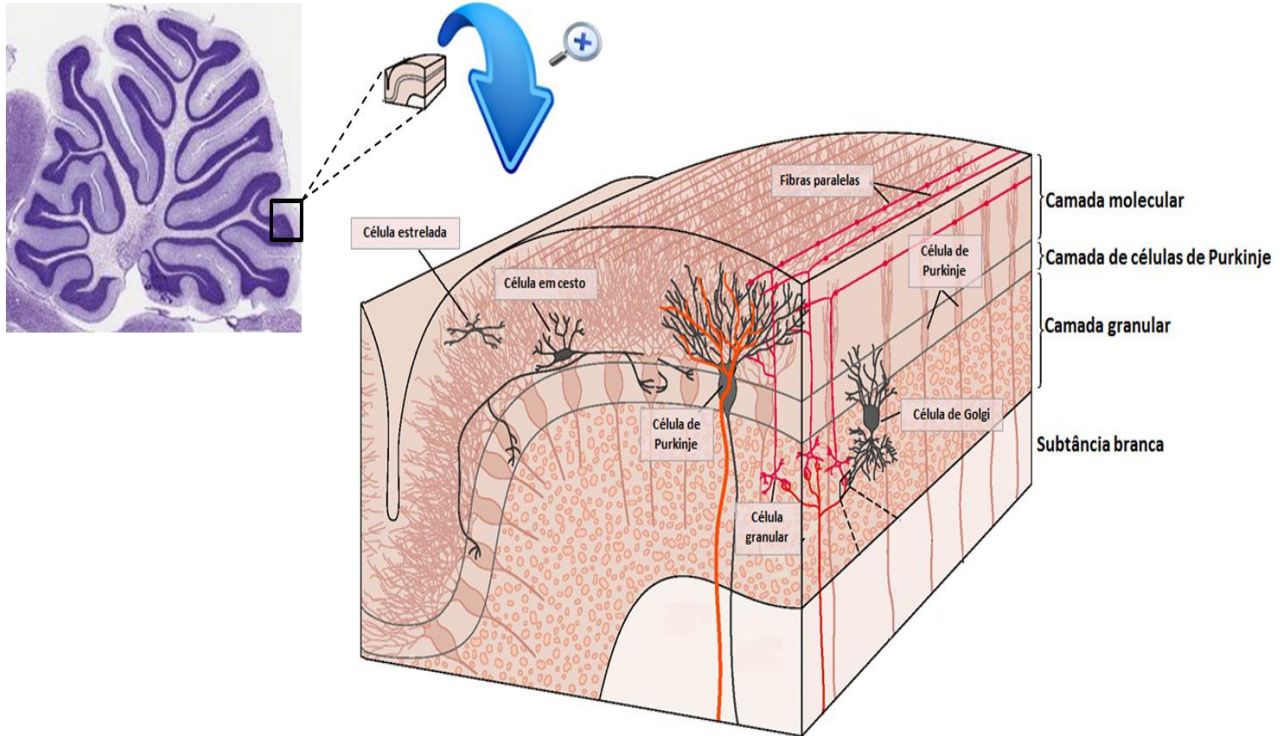
O encéfalo é coberto por membranas de tecido conjuntivo, sendo a mais interna a pia-máter. Esta está situada logo sobre a superfície do encéfalo, mas seu tecido conjuntivo também circunda os vasos sanguíneos e seu epitélio se estende para o terceiro e quarto ventrículos formando o plexo coróide, onde é produzido o líquido cefalorraquidiano (Gartner & Hiatt, 1999). Abaixo dessa meninge, tanto no cérebro como no cerebelo, está presente um córtex formado pela substância cinzenta e uma área mais interna formada pela substância branca (Junqueira & Carneiro, 2004).

A substância cinzenta é dividida em camadas funcionais que variam de acordo com os tipos de corpos celulares encontrados. No cérebro há 6 camadas, da superfície do córtex em direção à substância branca: 1) camada molecular (maior parte formada por fibras e células da neuroglia); 2) granular externa (constituída por pequenos neurônios piramidais); 3) de células piramidais externa (constituída por neurônios piramidais médios); 4) granular interna (presença de células estreladas); 5) de células piramidais interna (formada por neurônios piramidais grandes) e 6) de células fusiformes (apresenta células polimórficas) (Figura 1.4). No cerebelo as camadas estão dispostas em: camada molecular (com células

em cesto e estreladas), a de células de Purkinje e granular (dispondo de pequenos neurônios chamados de células granulares e de Golgi) (Gartner & Hiatt, 1999). Já a substância branca é formada apenas por axônios dos neurônios e células da neuroglia. (Figura 1.5)



**Figura 1.4:** Representação esquemática das seis camadas de células neuronais no córtex cerebral em corte longitudinal do encéfalo (modificado de Mikula *et al.*, 2007; Brown, 2012; Pacheco *et al.*, 2014).

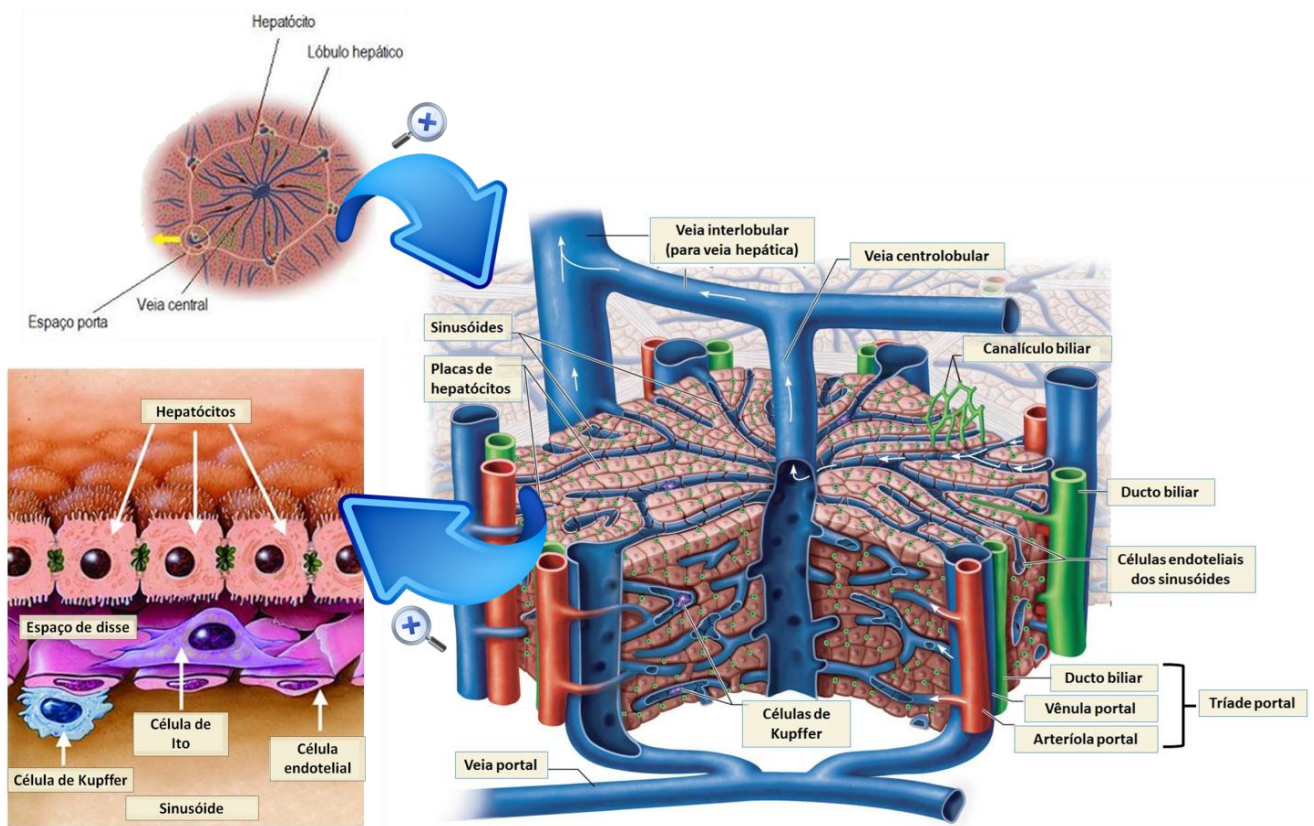


**Figura 1.5:** Representação esquemática da substância cinzenta e da substância branca do tecido cerebelar (modificado de Mikula *et al.*, 2007; Kandel *et al.*, 2012).

### 1.9.2. Tecido hepático:

O parênquima hepático é constituído principalmente pelos hepatócitos, que formam uma massa poliédrica, denominada lóbulo hepático. Em sua região central encontra-se a veia centrolobular, por onde o sangue é drenado do fígado para a veia hepática (Figura 1.6). Nos ângulos desse poliedro está presente o espaço porta, que irriga o tecido com sangue arterial, através da artéria hepática, e com o sangue proveniente das veias do tubo digestivo (pâncreas e baço), através da veia portal (Figura 1.6). Além disso, o espaço porta também contém o ducto biliar, nervos e vasos linfáticos (Ross & Romrell, 1993; Gartner & Hiatt, 1999).

Entre as placas de hepatócitos estão os sinusóides, que são capilares com paredes revestidas por células endoteliais e macrófagos, denominados células de Kupffer. Separando as células endoteliais dos hepatócitos há o espaço Disse, acomodando as células de Ito e os microvilos dos hepatócitos (figura 1.6) (Ross & Romrell, 1993; Rubin & Farber, 2002; Junqueira & Carneiro, 2004).



**Figura 1.6:** Morfologia do lóbulo hepático e suas estruturas vasculares e celulares (modificado dos sites webstudy e Johns Hopkins Medicine, e Friedman, 2000).

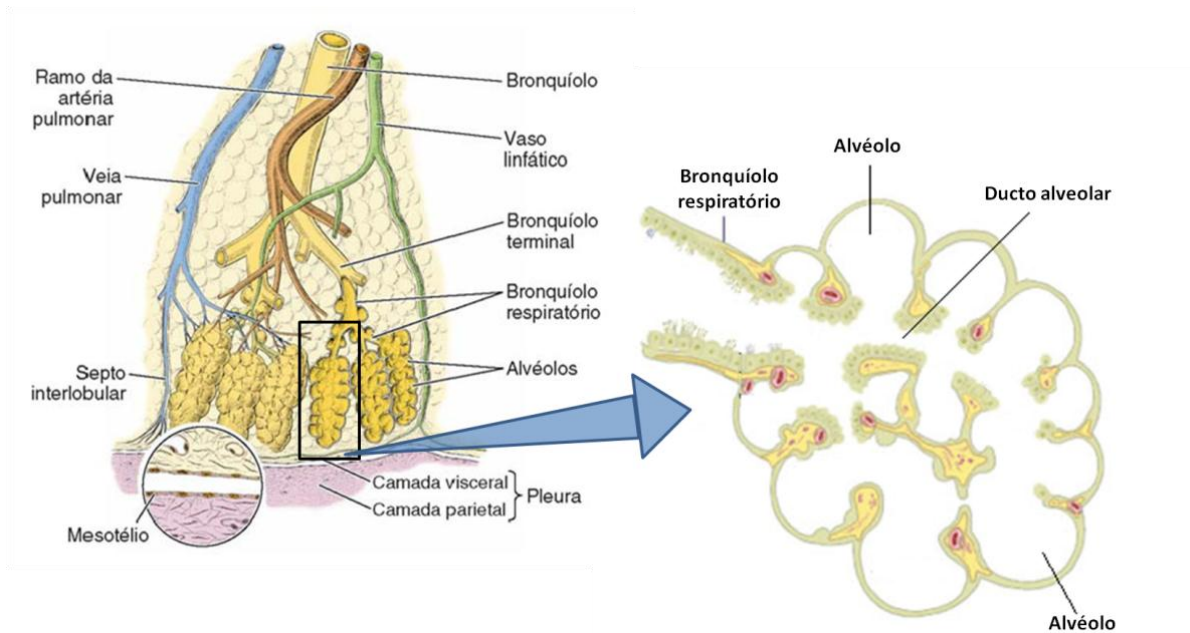
### 1.9.3. Tecido pulmonar:

O tecido pulmonar é constituído por uma árvore brônquica formada por dois brônquios primários que entram nos pulmões através do hilo, onde também entram as artérias e veias e saem os vasos linfáticos. Cada brônquio divide-se em bronquíolos e estes, por sua vez, se ramificam em bronquíolos terminais. Por conseguinte, um bronquíolo terminal origina um ou mais bronquíolos respiratórios, dos quais derivam os ductos alveolares que terminam em sacos alveolares compostos por diversos alvéolos, onde ocorrem as trocas gasosas no pulmão (figura 1.7) (Da Silva, 2012; Junqueira & Carneiro, 2004).

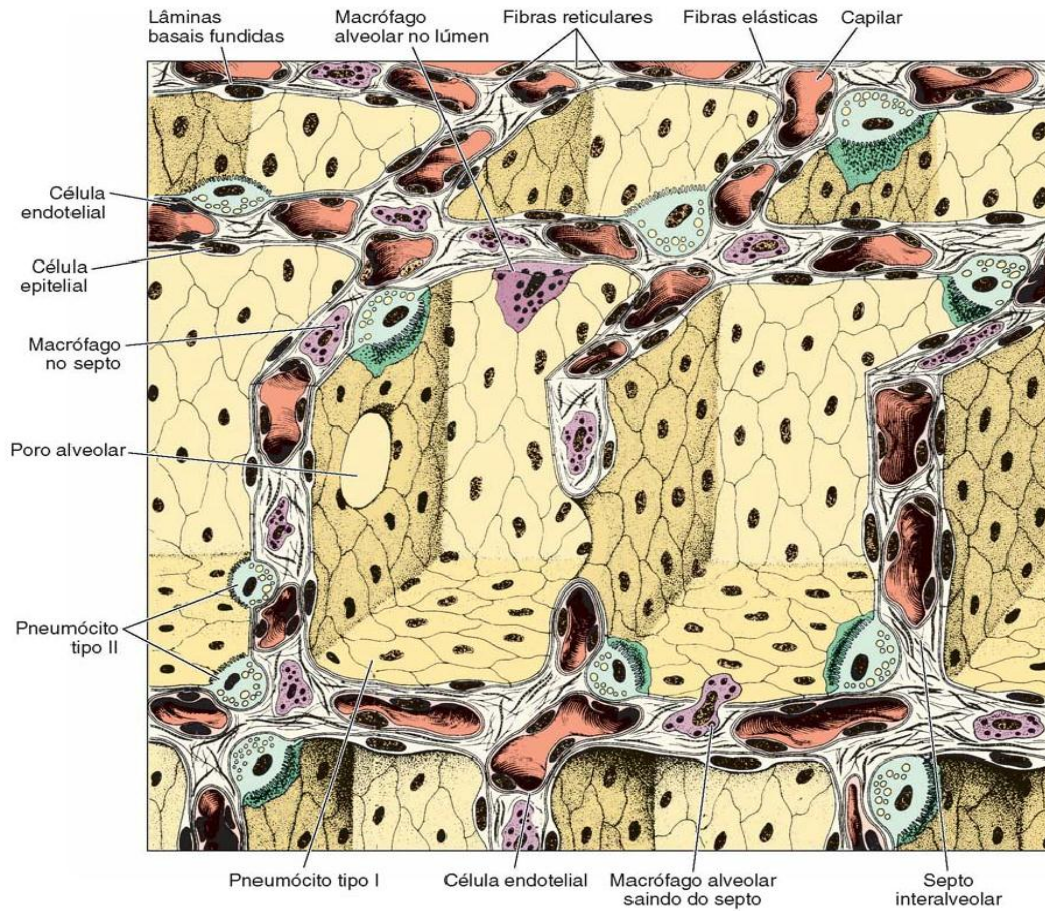
Entre dois alvéolos vizinhos, há o septo interalveolar formado por uma parede composta por uma fina camada de tecido conjuntivo, rico em capilares e constituído por fibras reticulares e elásticas, fibroblastos, linfócitos, mastócitos e macrófagos alveolares



(Hib, 2003; Junqueira & Carneiro, 2004). Este tecido se interpõe entre duas camadas de epitélio pavimentoso, formadas em maior parte por pneumócitos do tipo I, cuja principal função é a de constituir uma barreira que possibilite as trocas gasosas e ao mesmo tempo bloqueie a passagem de líquido para o lúmen do alvéolo (Hib, 2003). O epitélio também é formado pelos pneumócitos do tipo II, que estão presentes entre os pneumócitos do tipo I e são responsáveis por liberar o surfactante, que diminui a tensão entre o ar e o epitélio do alvéolo e facilita o intercâmbio gasoso (figura 1.8) (Gartner & Hiatt, 1999).



**Figura 1.7:** Morfofisiologia do tecido pulmonar. A) Árvore brônquica junto à circulação sanguínea e linfática em um lóbulo pulmonar. B) Porção respiratória pulmonar, composta pelo bronquíolo respiratório e por diversos alvéolos (Modificado de Junqueira & Carneiro, 2004 e *Department of Pathology College of Veterinary Medicine, UGA, 2010*).



**Figura 1.8:** Citoarquitetura dos alvéolos pulmonares. O parênquima pulmonar composto de septos interalveolares revestidos por capilares, células (pneumócitos tipo I e II, macrófagos alveolares e células endoteliais) e o tecido conjuntivo (Junqueira & Carneiro, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Estudar aspectos da histopatologia da dengue em diferentes tecidos de camundongos BALB/c infectados com DENV2 pela via i.c. e comparar com o observado em animais imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com o vírus.

### **2.1- Objetivos específicos**

- Analisar e quantificar os danos histopatológicos causados pela infecção com DENV2, no cérebro, cerebelo, fígado e pulmão de camundongos infectados pela via i.c. e avaliar a proteção mediada pela vacina de DNA pcTPANS1;
- Investigar a presença de DENV2 e do seu antígeno no sangue e outros tecidos em camundongos infectados, vacinados ou não;
- Avaliar os níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST nos camundongos infectados, vacinados ou não.

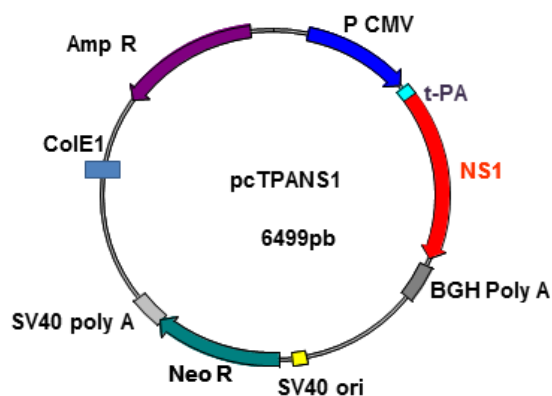
### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Vírus**

Nos experimentos com camundongos utilizamos o vírus da dengue sorotipo 2 (DENV2), cepa Nova Guiné C (NGC) (GenBank M29095), neuroadaptado por passagens em cérebro de camundongos suíços neonatos.

#### **3.2 Plasmídeo vacinal**

Neste trabalho avaliamos uma vacina de DNA, previamente construída pela equipe do laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais, quanto ao seu efeito em diversos tecidos de camundongos, após o desafio com DENV2. Essa vacina é constituída pelo plasmídeo pcTPANS1, derivado do vetor pcDNA3 (Invitrogen), e contém: o gene *ns1* que codifica a proteína NS1 de DENV2 NGC fusionado ao peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), a região promotora derivada do citomegalovírus humano (CMV), a sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH), a origem de replicação do vírus SV40 e o gene que confere resistência à neomicina (Figura3.1) (Costa *et al*, 2006,2007). Além disso, este plasmídeo também contém uma origem de replicação em células procarióticas (ColE1) e o gene que confere resistência a ampicilina, que são úteis para a seleção de bactérias contendo tal plasmídeo.



**Figura 3.1:** Representação esquemática do plasmídeo pcTPANS1. t-PA- sequência que codifica o peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano; NS1- gene *ns1* de DENV2; P CMV- promotor derivado do citomegalovírus humano; ColE1- origem de replicação em *E. coli*; BGH polyA- sequência de poliadenilação derivada do hormônio de crescimento bovino; SV40 ori - origem de replicação derivada do vírus SV40; *NeoR*- gene de resistência à neomicina; *AmpR*- gene de resistência à ampicilina.

### 3.3 Infecção dos animais com DENV2

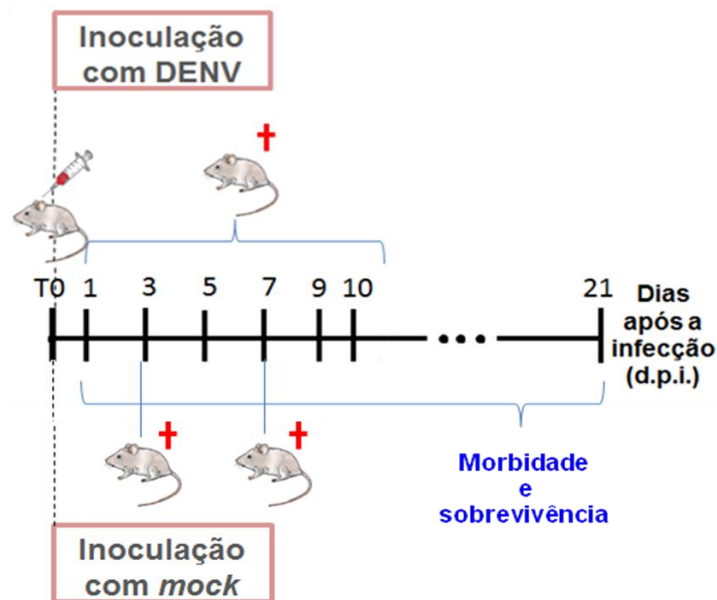
A cinética da infecção com DENV2 foi analisada em camundongos BALB/c machos e SPF (do inglês, *specific pathogen free*), com 8 semanas de idade provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB, Campinas/SP). Grupos de camundongos (n=5) foram inoculados com 30 µl de DENV2 por via intracerebral (i.c.), que corresponde a 40 LD<sub>50</sub>. Grupos de animais foram submetidos à eutanásia em cada ponto da cinética, ou seja, 1, 3, 5, 7 dias após a infecção (d.p.i.) e também nos pontos finais, de 8 a 11 d.p.i. após o aparecimento de morbidade (paralisia nos membros posteriores e comprometimento da coluna vertebral). Além disso, grupos controles (n=5) foram inoculados com 30µL de meio de cultura 199 (*mock*) e submetidos à eutanásia no 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia após a inoculação. Outro grupo de camundongos controle (n=5) também foi utilizado sem nenhuma inoculação (*naïve*).

Para o procedimento de inoculação do vírus ou *mock*, os animais foram sedados com uma mistura de cloridrato de ketamina (100 mg/kg animal) (Cristália) e de cloridrato de xilazina (10mg/kg animal) (Syntec) em de 100 µl solução salina de tampão fosfato (do inglês, *phosphate buffer saline*, PBS) estéril e inoculada por via intramuscular (i.m.). Para a

eutanásia, os camundongos foram inoculados com uma dose maior de cloridrato de xilasina (30 mg /kg animal) e de cloridrato de ketamina (400 mg /kg animal).

Os camundongos infectados com DENV2 foram submetidos à eutanásia, com coleta do sangue por punção cardíaca para análise da viremia ou dos níveis séricos das enzimas hepáticas. Também foram coletados o cérebro/cerebelo, fígado e pulmão para detecção do vírus ou para avaliações histopatológicas e detecções de antígenos virais por imunohistoquímica.

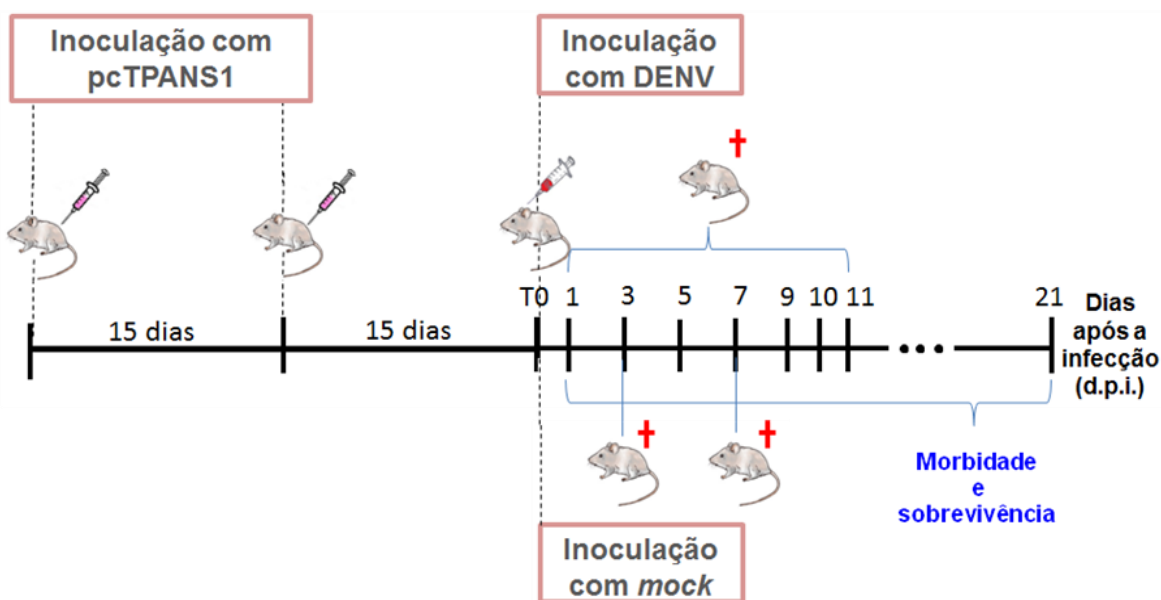
Todos os experimentos com camundongos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, CEUA-FIOCRUZ (P-12/11-3).



**Figura 3.2: Cinética de infecção dos camundongos inoculados com DENV2 por via i.c..** No começo da cinética (tempo zero = T0), os animais receberam o inóculo viral ou *mock*. Grupos de camundongos (n=5 a 10) infectados foram submetidos à eutanásia nos dias 1, 3, 5, 7, 9 e 10 após a infecção e o grupo controle no 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> d.p.i. para a coleta das amostras teciduais. Em outro experimento um grupo de animais infectados e um controle (*mock*) foram observados quanto a morbidade e sobrevivência durante 21 d.p.i.

### 3.4 Imunização dos camundongos com a vacina de DNA pcTPANS1

Camundongos BALB/c machos, com 4 semanas de vida, foram inoculados com duas doses da vacina de DNA pcTPANS1, administradas com intervalo de duas semanas. Para cada dose da vacina ou do controle foram inoculados 100 µg de DNA em 100 µl de PBS por animal (sendo 50 µg por pata). Quinze dias após a segunda dose da vacina, parte dos animais foi desafiada com DENV2 NGC, conforme descrito no item 3.3. Grupo de camundongos (n=5) foram submetidos à eutanásia nos dias 1, 3, 5, 7 ou 9-11 após o desafio viral, com coleta de sangue para análises dos níveis séricos das enzimas hepáticas e detecção de viremia, e retirada do cérebro/cerebelo, fígado e pulmão para as avaliações histopatológicas e detecções de antígeno viral.



**Figura 3.3:** Cinética de infecção dos camundongos imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2 por via i.c.. Inicialmente os animais receberam duas doses da vacina com intervalo de 15 dias e 30 dias após a primeira dose os animais foram desafiados (tempo zero = T0). Grupos de camundongos (n=5) foram submetidos à eutanásia nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11 após a infecção para a coleta das amostras teciduais. Em outro experimento um grupo de animais imunizados e desafiados (n = 10) foram observados quanto a morbidade e sobrevivência durante 21 d.p.i..

### 3.5 Detecção de DENV2 por ensaio de unidade formadora de plaque

Para a detecção do vírus foram utilizadas células epiteliais de rim de macaco (Vero). Para o seu plaqueamento, as células, obtidas em Biomanguinhos em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, foram dissociadas com 10 ml de solução de verseno com tripsina a 0,25% em solução EDTA 0,1% por 3 minutos a 37°C. A solução de dissociação foi retirada da garrafa e foram adicionados 10 ml de meio Earle's 199 completo (Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (90 ml de H<sub>2</sub>O estéril; 10 ml de meio Earle's 199 10x - Sigma; 5 ml SFB - Invitrogen; 1 ml (4mg/ml) de gentamicina - Invitrogen e 5 ml (4,4% / ml de meio 199) de bicarbonato de sódio - Sigma). As células foram quantificadas em câmara de Neubauer, visualizadas em microscópio invertido (Nikon eclipse TS 100). Foram adicionadas 10<sup>5</sup> células / poço em placas de 24 poços (BD Falcon™) e as placas foram mantidas durante 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub>, para a formação das monocamadas de células.

Para a detecção do vírus na circulação periférica e nos diversos órgãos após a inoculação com DENV2 por via i.c., o soro, metade do cérebro/cerebelo, um lobo do fígado e metade do pulmão foram retirados dos camundongos infectados ou não (*mock*) e armazenados em nitrogênio líquido. Para obtenção do soro, o sangue de cada animal foi centrifugado por duas vezes em microcentrífuga por 10 minutos a 6000 rpm. Os órgãos foram macerados em gelo com adição de meio 199 (para cada miligrama de órgão colocou-se 2 µL de meio) e vortexados por 15 segundos. O soro e os órgãos macerados foram diluídos seriadamente (10<sup>0</sup> a 10<sup>-5</sup>) e aplicados em duplicata sobre a monocamada confluenta de células Vero nas placas de 24 poços (confluência acima de 80%), por 1 hora. Após este período, o material infectante sobreposto às células foi retirado, em seguida foi aplicado o meio semi-sólido de carboximetilcelulose (CMC) com meio Earle's 199 completo suplementado com 5% SFB (79 ml de CMC 3%; 10 ml de meio 199 Earle's 10x - Sigma; 5 ml SFB - Invitrogen; 1ml (4 mg/ml) de gentamicina- Invitrogen e 5 ml (4,4% / ml) de bicarbonato de sódio- Sigma). As placas foram deixadas na estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 6 dias. Passado esse período, as células foram fixadas com formaldeído 10% e, no dia seguinte, coradas com cristal violeta (a solução com 5g de cristal violeta em pó - Merk; 12,5 ml de metanol - Merk e 250 ml de H<sub>2</sub>O destilada foi diluída 1:50) para a visualização



dos plaques. Os plaques foram quantificados manualmente utilizando um transluminador (White light transilluminator - UVP) e o título viral foi dado em unidade formadora de plaque/mL (PFU/mL, do inglês *plaque forming unit* / mL).

### 3.6 Detecção de DENV2 por PCR em tempo real

No intuito de detectar e quantificar o RNA do DENV2 na circulação sanguínea e nos órgãos periféricos dos animais infectados ou não (*mock*), foram utilizados tanto o soro, como metade do cérebro/cerebelo, do pulmão e um lobo do fígado, retirados dos animais e armazenados em nitrogênio líquido. Antes da etapa da extração do RNA viral, as amostras de sangue e órgãos foram processadas de modo semelhante ao descrito acima (item 3.5).

O RNA viral no soro foi isolado a partir de 140 µl de cada amostra com a utilização do QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Corporation), de acordo com as instruções do fabricante, e eluído em 60 µl de tampão de eluição proveniente no kit. Já para as amostras dos órgãos macerados, a extração do RNA foi feita por meio do RNeasy Mini Kit (QIAGEN Corporation), com um volume 75 µl de tecido macerado correspondente a 30 mg do órgão, também de acordo com as instruções do fabricante, e o RNA foi eluído em 40 µl de H<sub>2</sub>O estéril. Após a extração, o RNA do DENV2 foi submetido à transcrição reversa (RT) *in vitro* para gerar o cDNA, utilizando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada amostra foram utilizados 10 µl de RNA e 10 µl do *master mix* (2 µl de tampão RT 10X; 0,8 µl de uma mistura de *dNTP* 25X; 2 µl de oligonucleotídeos randômicos; 1 µl de inibidor de RNase; 3,2 µl de H<sub>2</sub>O livre de nuclease e 1 µl de transcriptase reversa *multiscribe*). As condições de amplificação foram: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. O cDNA resultante foi estocado à -20°C até o dia seguinte para posterior utilização na reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) em tempo real (qPCR)

O qPCR foi realizado em colaboração com Dr<sup>a</sup>. Gisela Freitas Trindade em BioManguinhos. Primeiramente, para o estabelecimento da curva padrão do RT-qPCR a ser usada na quantificação das amostras, foram realizadas diluições seriadas ( $10^8$  à  $10^{-1}$ ) do número de cópias de um plasmídeo que possui as sequências nucleotídicas alvos dos oligonucleotídeos e da sonda. Esse plasmídeo foi construído previamente no laboratório

através de clonagens utilizando o vetor TOPO do Kit TOPO-TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen) para gerar um plasmídeo recombinante contendo uma região específica e conservada da sequência E/NS1 do DENV2 NGC (número do geneBank: M29095) (TGGTTCCTAGACCTGCCGTTACCATGGCTACCCGGAGCGGACACACAAGG ATCAAATTGGATACAGAAAGAGA). Deste modo, a amplificação para gerar a curva padrão também serviu como um controle positivo dos oligonucleotídeos utilizados. Tanto a quantificação do cDNA da curva padrão quanto das amostras dos animais infectados com DENV2 foi realizada utilizando o kit TaqMan<sup>®</sup> One-Step PCR (Applied Biosystem, USA). Para cada reação de qPCR, em placa de 96 poços (Applied Biosystems), foram utilizados: 12,5 µl do master mix do kit, 5 µl de cDNA, 0,62 µl da sonda (10µM), 0,75 µl de cada oligonucleotídeo (0,1 pmol/ µl) (senso e anti-senso) e 5,4 µl de H<sub>2</sub>O. Para cada amostra, a amplificação foi realizada em duplicata da reação de RT-qPCR, sendo a quantidade de RNA viral estabelecida pela média. As sequências nucleotídicas dos oligonucleotídeos senso e anti-senso foram: 5'-TGGTTCCTAGACCTGCCGTTA-3' e 5'-TCTCTTTCTGTATCCAATTTGATCCTT-3', respectivamente. Também foi utilizada uma sonda fluorogênica, cuja sequência é 5'- CATGGCTACCCGGAGCGGACAC-3', que possui como molécula sinalizadora (*reporter*) o fluoróforo 6-carboxifluoresceína (FAM) acoplado à extremidade 5' e o *quencher* tetrametilrodamina (TAMRA) na extremidade oposta 3'. O ensaio do qPCR foi realizado utilizando o equipamento ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA), sob as condições de: 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 1 minuto a 72°C. O ciclo limiar (do inglês, *threshold cycle*, Ct) representa o primeiro ciclo do PCR no qual o software detecta um aumento da fluorescência da molécula *reporter* acima do sinal de base emitido. Foi estabelecido um *threshold* de 0.02 após a amplificação da curva padrão. Como controles positivos da reação do qPCR foi utilizada uma amostra de DENV2 NGC isolado de células Vero infectadas ou uma amostra do pool de cérebros de camundongos neonatos inoculados com DENV2 NGC. A quantidade de RNA viral em cada amostra foi estabelecida em Log<sub>10</sub> do número de cópias de RNA / mL.

### **3.7 Análise dos níveis séricos das enzimas hepáticas**

As amostras de sangue dos camundongos não infectados (*naïve* ou mock), inoculados com DENV2, ou imunizados com pcTPANS1, e desafiados com o vírus, foram coletadas e processadas para a obtenção do soro como descrito anteriormente para os ensaios de PFU e RT-qPCR . Os níveis séricos das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram quantificados por bioquímica seca com auxílio do equipamento Reflotron (Roche), utilizando 32 µL de cada soro.

### **3.8 Processamento do material biológico para análises histológicas e imunohistoquímica**

O cérebro, cerebelo, fígado e pulmão dos camundongos infectados com DENV2 e/ou imunizados com pcTPANS1, assim como seus controles, foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10% (100 mL de formol 40%, 4,0g de fosfato de sódio monobásico, 4,5g de fosfato de sódio bifásico em 900 mL de água destilada, pH 7,2). Posteriormente, os órgãos foram clivados e processados. Esse processamento consiste em lavar em água corrente durante 1 hora, desidratar em concentrações crescentes de etanol (70%, 90%, 100%) a 60°C, durante 15 minutos, seguido de 3 incubações com xilol por 15 minutos, em mesma temperatura. Os fragmentos dos órgãos foram então embebidos em parafina (Histosec Pastilhas, Merck) por 2 horas e emblocados com auxílio de um inclusor (BMJ-C Embedding Center). Os blocos de parafinas foram utilizados na obtenção de cortes finos com cerca de 4 µm de espessura em micrótomo (Leica RM-2235).

### **3.9 Coloração em Hematoxilina e Eosina (H.E)**

Para coloração em H.E, os cortes dos órgãos emblocados em parafina foram incubados por 30 minutos em estufa a 60°C e desparafinizados em três banhos de xilol por 10 minutos cada. Em seguida o material foi hidratado em três banhos de concentrações decrescentes de etanol (100 a 70%) por 5 minutos cada, lavados em água corrente por 10 minutos e corados com hematoxilina de Harris (5g de hematoxilina, 50 ml de álcool 95%,

2,5g de óxido de mercúrio, 100 ml de alúmen de potássio e 4 ml de ácido glacial) por 50 segundos. Após serem lavados em água corrente os cortes foram corados com Eosina-Floxina (10 ml de Floxina 1%, 100 ml de Eosina 1%, 760 ml de etanol 95%, 4 ml de ácido acético glacial) por 40 segundos. Por último, os cortes foram lavados em água corrente por 2 minutos e passados em três banhos de concentrações crescentes de etanol (70 a 100 %) e em três banhos de xilol, por 5 minutos cada. As lâminas foram montadas utilizando resina entelan (Merck) em lamínulas para observação em microscopia óptica de campo claro (microscópio de epifluorescência NIKON ECLIPSE E600).

### **3.10 Análises histopatológicas**

As quantificações das lesões teciduais foram realizadas de forma semiquantitativa em secções de cérebro, cerebelo, fígado e pulmão, corados por H.E. Os parâmetros utilizados na quantificação das lesões do fígado foram: edema, hemorragia e balonização de hepatócitos. Já no cérebro e cerebelo, foram quantificados: hemorragia, infiltrados na meninge e perivasculares. No pulmão, foram utilizados os seguintes parâmetros: edema, hemorragia e espessamento do septo interalveolar. Para cada parâmetro de lesão foi atribuído um valor numérico entre 0 e 4, de acordo com a severidade e extensão dos danos. Para a quantificação de alterações circulatórias (hemorragia e edema), infiltrados e espessamento do septo interalveolar: 0 = ausência, 1 = leve e focal, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = difuso. Para classificar a balonização hepatocitária, foram atribuídos os valores: 0 = ausência, 1 = áreas focais, 2 = áreas focais periportais, 3 = áreas extensas periportais, 4= difusa. Esses valores foram aferidos percorrendo toda a lâmina a ser quantificada através da microscopia óptica de campo claro (Microscópio de epifluorescência NIKON ECLIPSE E600).

### **3.11 Imunohistoquímica**

A técnica de imunohistoquímica foi empregada para detecção do antígeno viral NS3, utilizando anticorpos anti-NS3 produzidos em coelho pela Dr<sup>a</sup> Emiliania Mandarano

do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ, nos tecidos nervoso, hepático e pulmonar.

Inicialmente, foram obtidos cortes de cérebro, cerebelo, fígado e pulmão de 4 µm de espessura, sendo estes coletados em lâminas com 8% de silane (3-aminopropiltriétoxissilane, Sigma), o que possibilita o aumento da adesão do corte na lâmina. As lâminas foram incubadas na estufa a 60°C por 30 minutos, antes da realização da reação. Em seguida passaram pela etapa de desparafinização em 3 banhos em xilol, 3 banhos em etanol e lavadas em água destilada. Na etapa seguinte os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em panela de pressão (Britânia BP5L) a 100 °C por 5 minutos com o tampão citrato (100 mL de tampão citrato - Diagnostic Biosystem e 900 mL de H<sub>2</sub>O destilada, pH 6,0). Após este procedimento, as lâminas foram esfriadas à temperatura ambiente, lavadas com água destilada e três vezes com tampão de lavagem Tris-HCl ( 3,8 ml de HCl 1N; 0,6g de Trizma® base – Sigma; 8g de NaCl e 1L de H<sub>2</sub>O destilada; pH 7,4). Em seguida, o material foi incubado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e metanol (diluição 1:1) por 10 minutos com o intuito de bloquear a peroxidase endógena. Após lavar mais três vezes com o tampão Tris-HCl, a solução de bloqueador de proteínas (*Protein Block* – Spring Bioscience) foi aplicada sobre os cortes por 10 minutos, no intuito de bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos e, posteriormente os cortes foram lavados novamente com Tris-HCl. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-NS3 (diluído 1:50), por 12h a 4°C. Em seguida, as lâminas foram deixadas a temperatura ambiente por 20 minutos, lavadas por três vezes com o tampão Tris-HCl e incubadas em câmara úmida a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado a peroxidase (*REVEAL polyvalent HRP* - Spring Bioscience), por 10 minutos, e o seu complemento (*REVEAL polyvalent HRP* - Spring Bioscience) por 15 minutos. Após estas etapas as lâminas foram lavadas com o tampão Tris-HCl e água destilada, e reveladas com o substrato para peroxidase, diaminobenzidina (DAB) (Kit DAB – Diagnostic Biosystems). Após a adição desse revelador, as lâminas foram mergulhadas em água destilada, lavadas em água corrente e contrastadas com Hematoxilina de Harris (Sigma) por 50 segundos. Ao final da técnica as lâminas foram novamente lavadas em água corrente, mergulhadas em três banhos de álcool e três banhos de xilol e montadas com lamínula usando entelan (Merck). O material foi

analisado em Microscópio de Epifluorescência NIKON ECLIPSE E600, contendo uma câmera fotográfica Cool SNAP- Procf COLOR acoplada.

### **3.12 Análises Estatísticas**

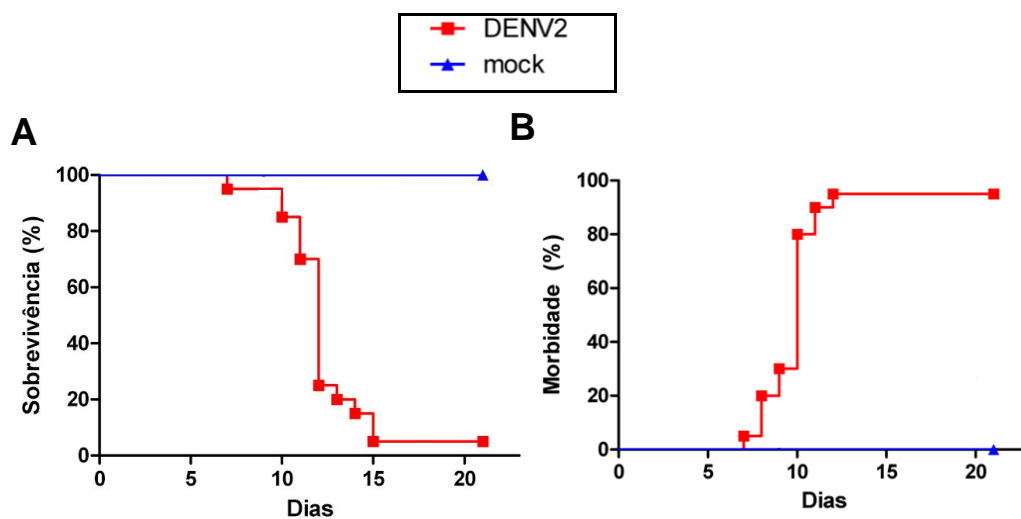
Nas análises estatísticas da semiquantificação das alterações histopatológicas, dos níveis séricos das enzimas hepáticas e dos títulos virais no cérebro/cerebelo foi utilizado o teste de Mann-Whitney, através uso do software GraphPad Prism, versão 4.03, em que os valores considerados foram significantes quando  $P < 0.05$ . Para a análise da sobrevivência e morbidade dos animais foi utilizado o teste estatístico de Log – Rank, também através do software GraphPad Prism, cujos valores significantes foram dados quando  $P < 0,0001$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Camundongos infectados com DENV2

#### 4.1.1. Sobrevivência e morbidade dos animais infectados com DENV2

A maior parte dos camundongos BALB/c inoculados por via intracerebral com DENV2, cepa Nova Guiné, foi a óbito cerca de 15 dias após a infecção (mais de 80%). Além disso, a maioria dos animais apresentaram morbidade, como paralisia nos membros posteriores e comprometimento da coluna cervical, a partir do 8<sup>o</sup> dia pós infecção (d.p.i.).



**Figura 4.1 Susceptibilidade de camundongos à infecção com DENV2.** Curvas de sobrevivência (A) e morbidade (B) dos camundongos BALB/c acompanhados por 21 dias após a inoculação viral pela via i.c. O grupo controle recebeu apenas a inoculação do *Mock* por via i.c. Os dados representam a compilação de dois experimentos independentes com grupos de 9 à 10 animais em cada teste.

#### 4.1.2. Histopatologia do cérebro e cerebelo dos camundongos infectados com DENV2

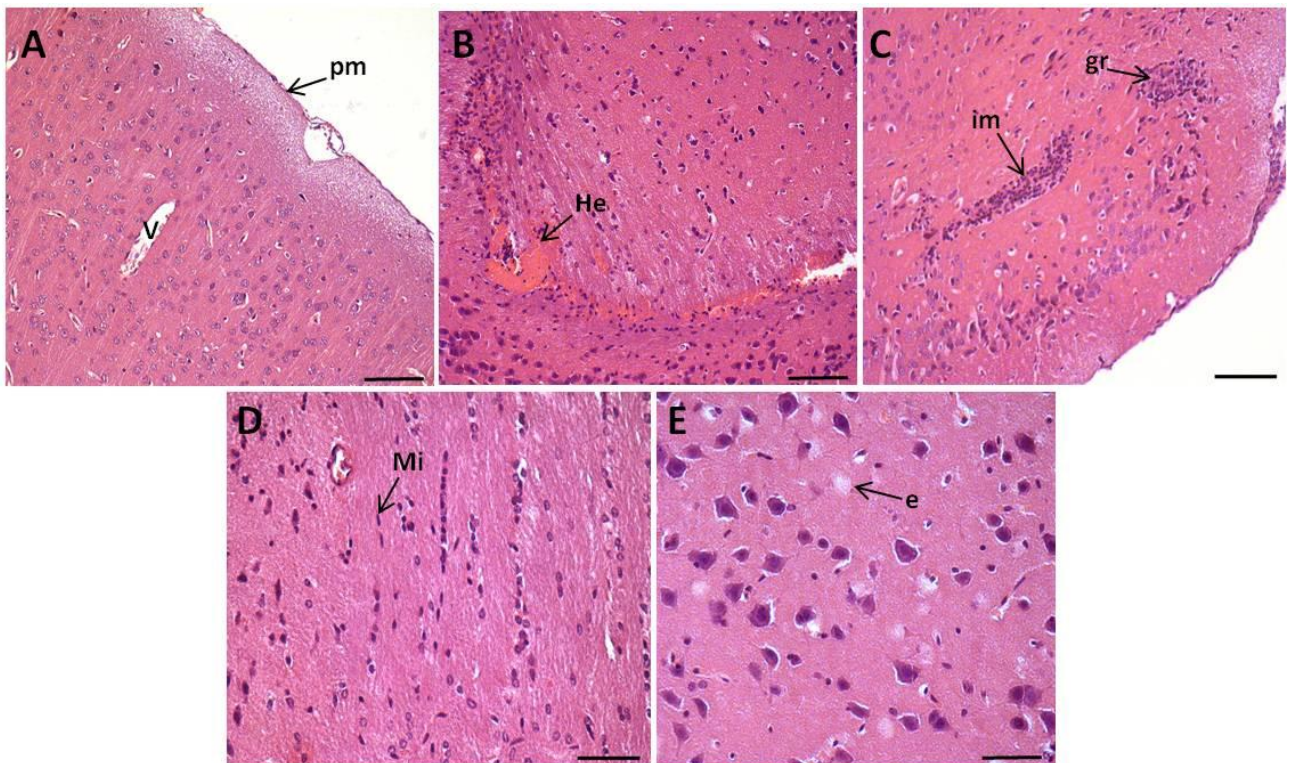
Iniciamos as análises histopatológicas do cérebro e cerebelo dos animais somente infectados com o DENV2, comparando-as às análises dos animais inoculados com o *mock*. Vimos que no 7<sup>o</sup> dia após a inoculação os animais controle, *mock*, não apresentaram sinal de inflamação ou danos circulatórios nos tecidos cerebral (Figura 4.2 A) ou cerebelar

(Figura 4.4 A). No entanto, no 1<sup>o</sup> d.p.i. o tecido cerebral dos animais infectados apresentou áreas de hemorragias e aparentemente áreas que sugerem edemas (Figura 4.2 B, 4.5 A e 4.2 E), sendo observado um edema difuso na região cortical (Figura 4.5B). Além disso, foram observadas áreas focais de gliose reacional, junto ou não ao infiltrado mononuclear no córtex cerebral (Figura 4.2 C). A região da pia-máter não apresentou um infiltrado inflamatório muito evidente, apenas poucas áreas com leve infiltrado (Figura 4.2 C, 4.5 C e 4.4 C). Além disso, na substância branca tanto do cérebro quanto do cerebelo foi observada a hiperplasia de células da microglia (Figura 4.2 D, 4.4 D e 4.4E). No 3<sup>o</sup> d.p.i., o tecido cerebral mostrou o aparecimento em grau leve de infiltrado inflamatório na pia-máter e perivascular (Figura 4.3 A, 4.3 C, 4.5 C e 4.5 D), e a continuidade das alterações circulatórias, sendo que houve a diminuição do edema (Figura 4.5 A e B). Os focos de gliose reacional também se mantiveram (Figura 4.3 B). No tecido cerebelar foram observadas alterações nos neurônios de Purkinje (Figura 4.4 F), que se mostraram mais acidófilos, sugerindo talvez um processo de degeneração. No 5<sup>o</sup> d.p.i. destacou-se no tecido cerebral o surgimento de infiltrado mononuclear nos plexos coróides (Figura 4.3 D), sendo que o tecido ainda apresentava as demais alterações citadas anteriormente nos outros tempos da cinética. Já no 7<sup>o</sup> d.p.i., além da presença das alterações hemorrágicas (Figura 4.3 G) e do infiltrado na pia-máter (Figura 4.3 J), houve aparentemente um aumento dos focos de gliose reacional (Figura 4.3 F) e um aumento significativo dos infiltrados perivasculares em comparação aos camundongos *mock* (Figura 4.3 E, 4.3 F e 4.5 D). Por outro lado, neste tempo da cinética ocorreu a diminuição dos focos de edema (Figura 4.5 B). No 10<sup>o</sup> d.p.i. foi observado um aumento do infiltrado perivascular e na pia-máter na maioria dos camundongos estudados (Figura 4.3 J, 4.5 C e 4.5 D), além do maior número de microglia e do processo de gliose no córtex cerebral (Figura 4.3 H e I). Apesar de quase não haver mais áreas de edema, os focos de hemorragia ainda se fizeram presentes (Figura 4.3 G, 4.5 A e 4.5 B). No cerebelo, no 10<sup>o</sup> d.p.i. foi observada uma pia-máter mais espessa devido ao infiltrado inflamatório, um infiltrado discreto ao redor de alguns vasos e áreas focais de hemorragia (4.4 G - J).

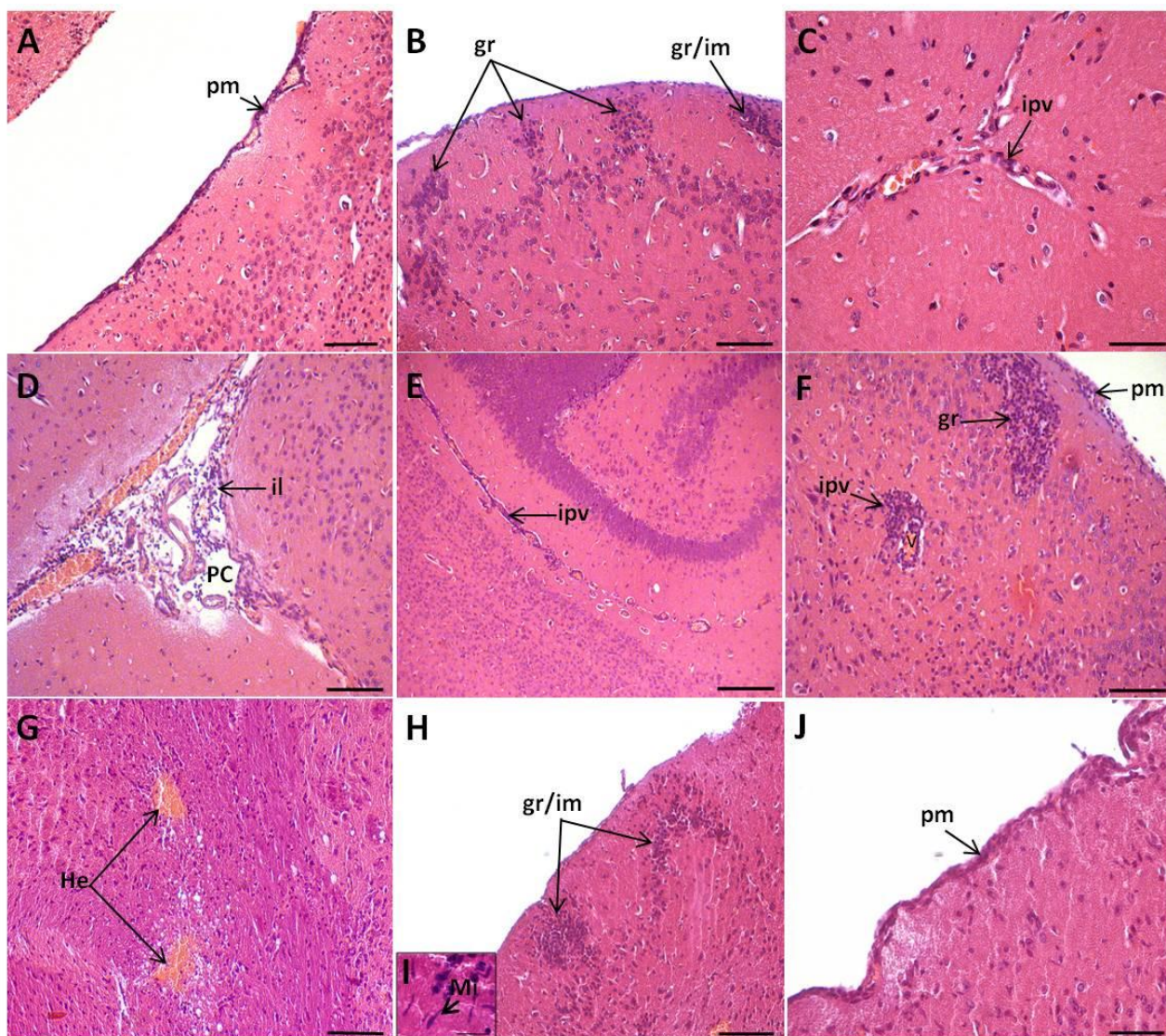
Em resumo, o tecido cerebral evidenciou lesões hemorrágicas, assim como áreas focais de gliose reacional, acompanhadas ou não de infiltrado pelo córtex cerebral durante toda a cinética. Entretanto, o extravazamento de plasma pareceu ser mais intenso no início



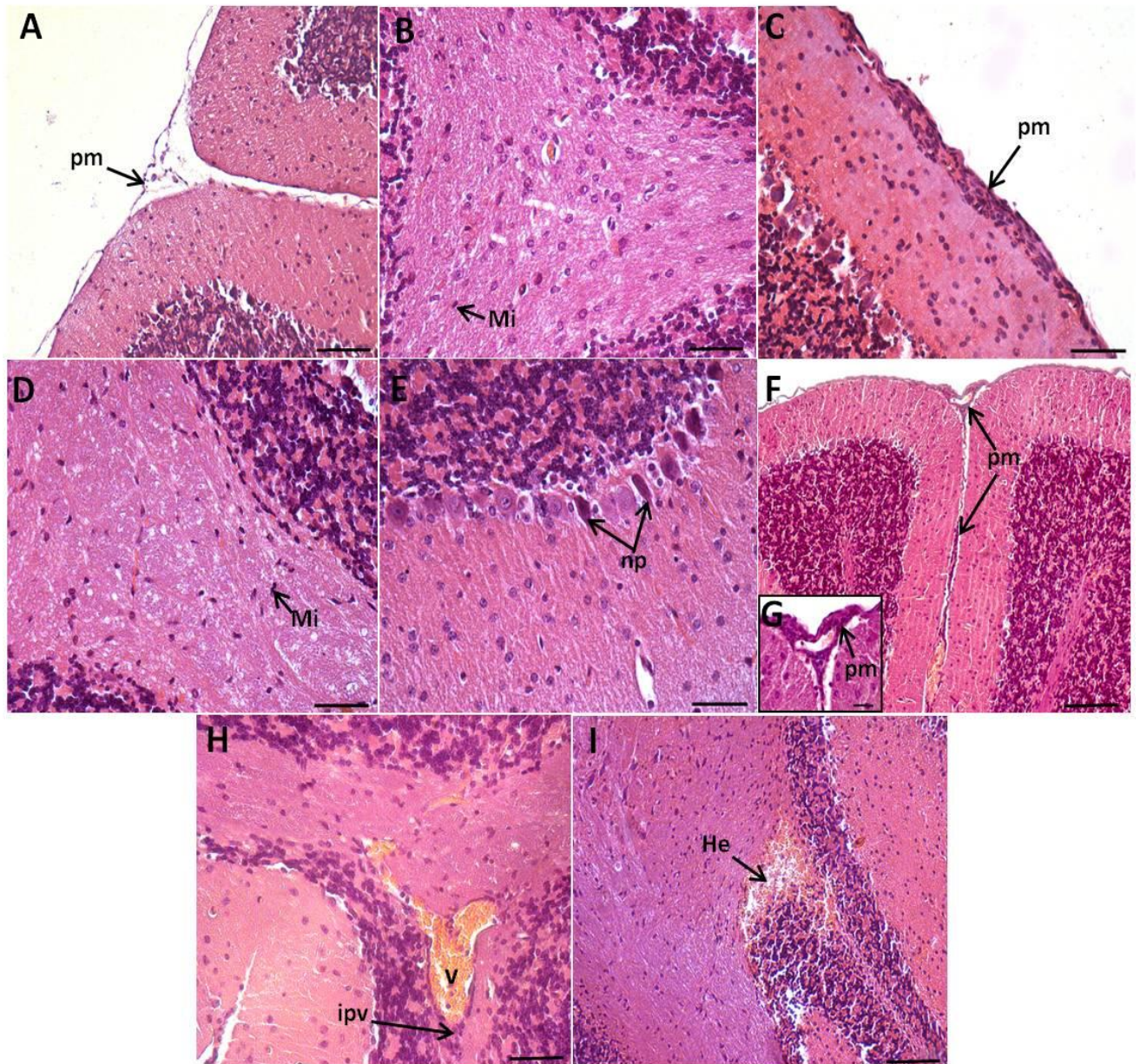
da cinética, ocasionando edemas pelo córtex, que diminuíram no decorrer do tempo. Logo no início da cinética (no 3<sup>o</sup> d.p.i.), os infiltrados inflamatórios começaram a surgir na pia-máter e ao redor dos vasos mas somente no 5<sup>o</sup> d.p.i. a inflamação dos plexos coróides foi detectada no terceiro ventrículo. No final da cinética houve um aumento dos infiltrados perivascularares e da pia-máter, assim como hiperplasia de microglia. Já o tecido cerebelar apresentou durante toda a cinética alterações discretas. No 1<sup>o</sup> d.p.i. foi observada a presença de hiperplasia de microglia na substância branca, com redução ao final da cinética. Foi notada também uma mudança morfológica nos neurônios de Purkinje no início da infecção, no 3<sup>o</sup> d.p.i., enquanto que no final da cinética houve um leve aumento de infiltrado na pia-máter e ao redor dos vasos, assim como áreas focais de hemorragia, principalmente na substância branca.



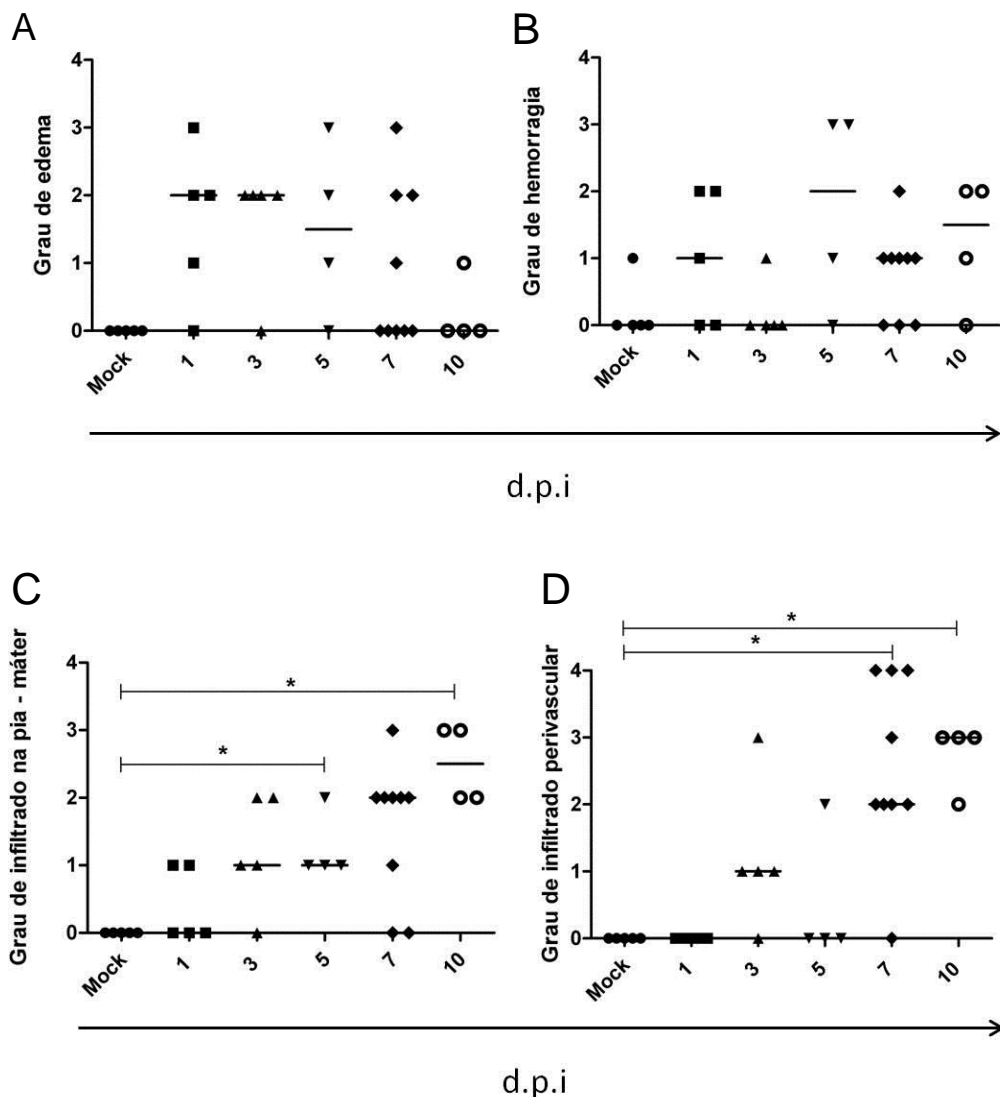
**Figura 4.2: Aspectos histopatológicos do tecido cerebral em camundongos BALB/c infectados (1<sup>o</sup> d.p.i.) com DENV2 ou inoculados com *mock*.** Córtex cerebral de um camundongo inoculados somente com *mock* (A); Animais infectados com DENV2 no 1<sup>o</sup> d.p.i., mostrando áreas de hemorragia (B); focos que sugerem gliose reacional e infiltrado mononuclear no córtex cerebral (C); hiperplasia de microglia na substância branca (D) e áreas que sugerem edema (E). pm – pia-máter; He – hemorragia; gr – gliose reacional; Mi –Microglia; e – edema; im – infiltrado mononuclear. Os cortes foram corados com HE e visualizados em microscopia de campo claro. Barras = 200 µm (B); 100 µm (A e C) e 50 µm (D e E).



**Figura 4.3: Aspectos histopatológicos do tecido cerebral em camundongos BALB/c infectados (3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> d.p.i.) com DENV2.** Animais infectados com DENV2 no 3<sup>o</sup> d.p.i., exibindo espessamento na pia-máter (A); focos que sugerem gliose reacional acompanhados ou não de infiltrado mononuclear no córtex cerebral (B); infiltrado perivascular (C). Animal no 5<sup>o</sup> d.p.i. exibindo infiltrado linfocitário na área do terceiro ventrículo (plexo coróide) (D), e no 7<sup>o</sup> d.p.i. mostrando um aumento do infiltrado perivascular e dos focos de gliose reacional (E e F). Camundongo no 10<sup>o</sup> d.p.i. revelando áreas de hemorragia (G), focos mais extensos de gliose reacional acompanhados de infiltrado mononuclear (H), hiperplasia de células microgлияis no córtex (I) e espessamento da pia-máter (J). pm – pia-máter; im – infiltrado mononuclear; gr – gliose; gr/im – gliose reacional e infiltrado mononuclear; ipv – infiltrado perivascular, il – infiltrado linfocitário, PC – plexo coróide; v- vaso sanguíneo; He – hemorragia; Mi –Microglia. Os cortes foram corados com HE e visualizados em microscopia de campo claro. Barras = 200  $\mu$ m (E); 100 $\mu$ m (A, B, D, F, G, H); 50 $\mu$ m (C, J) e 20  $\mu$ m (I).



**Figura 4.4: Aspectos histopatológicos do tecido cerebelar em camundongos BALB/c infectados (1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, e 10<sup>o</sup> d.p.i.) com DENV2 ou inoculados com *mock*.** Córtex cerebelar de um camundongo inoculado somente com *mock* (A e B). Animais infectados com DENV2 no 1<sup>o</sup> d.p.i., exibindo espessamento na pia-máter (C) e hiperplasia de microglia na substância branca (D). Camundongo no 3<sup>o</sup> d.p.i. exibindo degeneração nos neurônios de Purkinje (E) e no 10<sup>o</sup> d.p.i. mostrando aparecimento de infiltrados na pia-máter (F e G), e perivascular (H), e focos de hemorragia (I). pm- pia-máter; Mi –microglia; np – neurônio de Purkinje; v- vaso sanguíneo; ipv – infiltrado perivascular; He – hemorragia. Os cortes foram corados com HE e visualizados em microscopia de campo claro. Barras = 100μm (A, F, I); 50μm (B, C, D, E, H) e 20 μm (G).



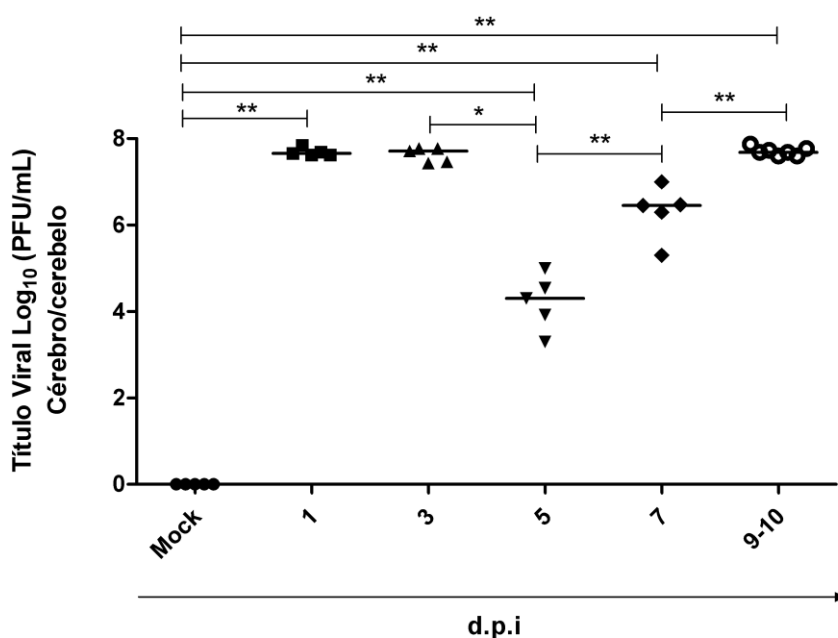
**Figura 4.5: Análise semiquantitativa das alterações no tecido cerebral dos camundongos infectados com DENV2, nos dias 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> d.p.i.** Foram atribuídos graus utilizando uma escala subjetiva de 0 a 4 para as diferentes alterações. Alterações circulatórias: 0 = ausência de dano, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = grave e focal e 4 = grave e difuso. Infiltrados: 0 = ausência, 1 = leve e focal, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = difuso. (n = 4 a 9). Barras = mediana. Teste estatístico de Mann – Whitney. (\* p < 0,019).

#### 4.1.3. Detecção de partículas infecciosas de DENV2 no tecido nervoso dos camundongos infectados

Como a inoculação do vírus foi realizada pela via i.c, iniciamos os estudos para detecção de partículas infecciosas de DENV2 no cérebro/cerebelo destes camundongos, em

diferentes pontos da cinética. As amostras foram processadas e aplicadas nas monocamadas de células Vero para a detecção de unidades formadoras de plaque (p.f.u, do inglês *plaque forming unit*). Um grupo controle inoculado apenas com o *mock* também foi utilizado, sendo realizada a eutanásia no 3<sup>o</sup> dia após a inoculação.

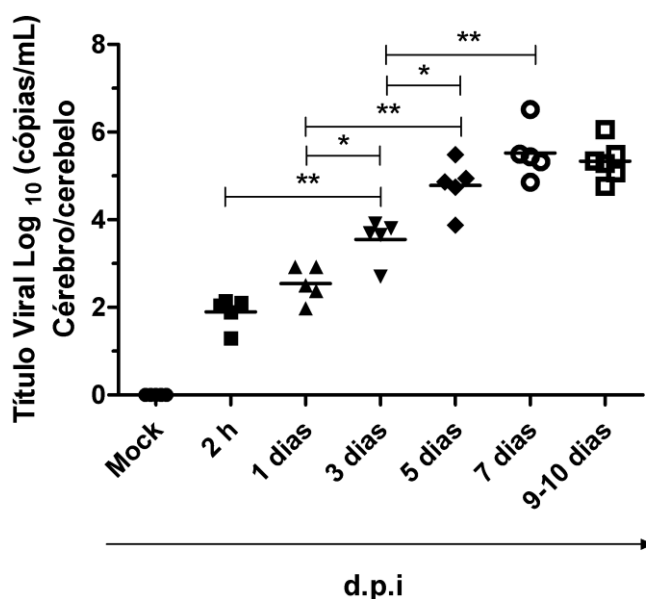
Todos os animais infectados com DENV2 apresentaram altos títulos do vírus no cérebro/cerebelo ao longo de todos os dias da cinética, cujos valores foram expressos em Log10 (Figura 4.6). Como era de se esperar, o grupo controle (*mock*) não apresentou formação de plaque viral, e os títulos virais dos animais infectados se mostraram estatisticamente significativos em todos os pontos da cinética quando comparados a este controle. Vale ressaltar que o limite máximo de detecção estabelecido no experimento foi 10<sup>-6</sup>. Curiosamente, observamos uma queda nos títulos virais dos animais infectados no 5<sup>o</sup> d.p.i., com um aumento progressivo nos dias seguintes (7 e 9-10 d.p.i.).



**Figura 4.6: Título de partículas virais infecciosas no cérebro/cerebelo de camundongos BALB/c inoculados com DENV2.** Os macerados do cérebro/cerebelo dos animais inoculados com o *mock* foram utilizados como controle. O título viral foi calculado através da quantificação de pfu em monocamada de células Vero. (n = 5 a 7). Barras = mediana. Teste estatístico de Mann – Whitney. (\*p < 0,0119; \*\*p < 0,0079).

#### 4.1.4. Detecção por RT-qPCR de RNA de DENV2 no cérebro/cerebelo dos animais

Posteriormente, após a detecção das partículas infecciosas por formação de plaque, o RNA viral foi quantificado por PCR em tempo real no tecido nervoso dos camundongos (macerado de cérebro/cerebelo) durante os tempos de 2 horas, 1, 3, 5, 7 e 9-10 dias após a inoculação com o DENV2 por via i.c. Observamos que o título viral aumentou de forma gradual a partir de 2 h após a infecção, atingindo o máximo nos pontos finais da cinética (7 e 9-10 d.p.i.) (Figura 4.7).

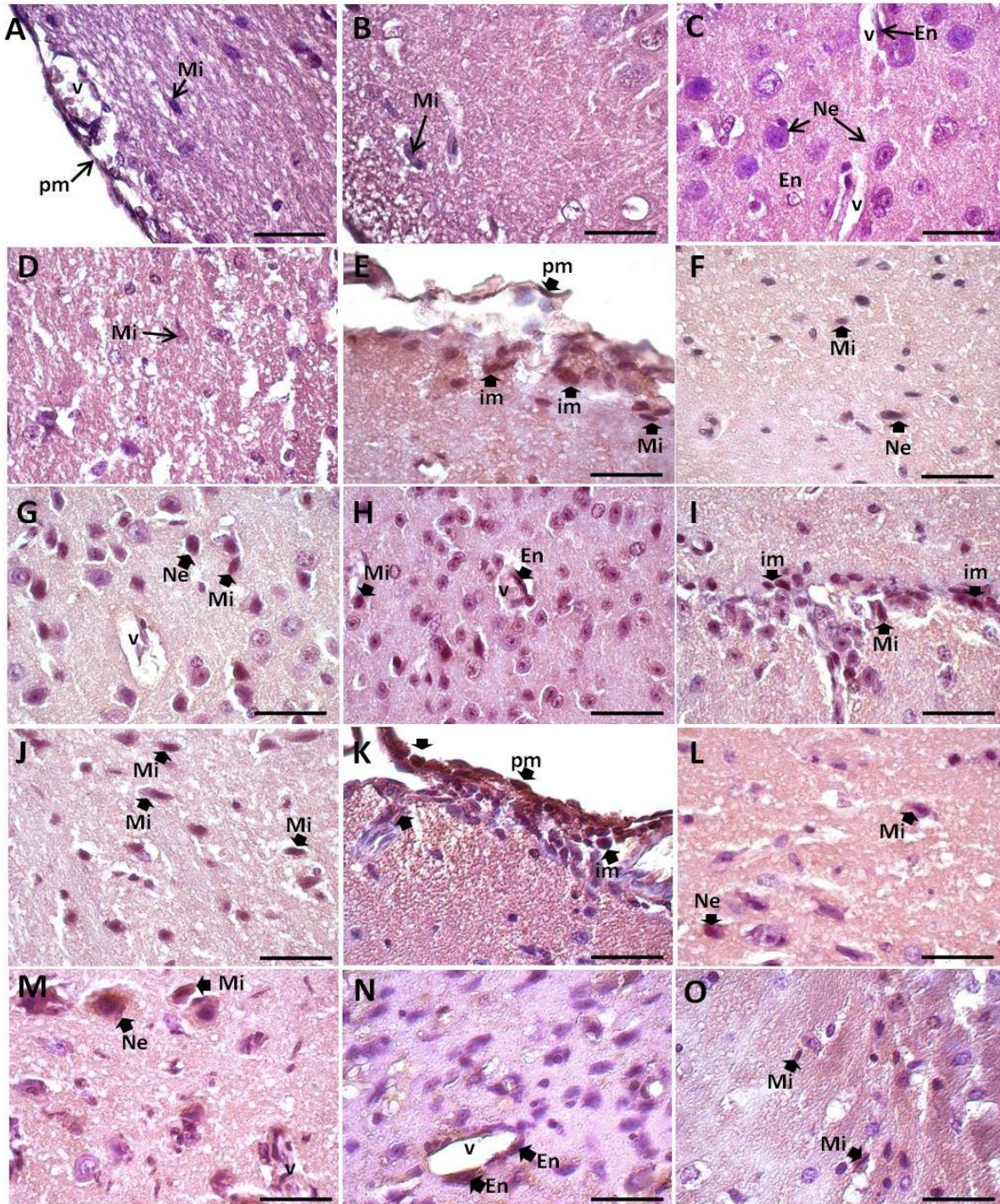


**Figura 4.7:** Quantificação do número de cópias do RNA viral no cérebro/cerebelo de camundongos BALB/c infectados com DENV2 através de RT-qPCR. Animais inoculados com o *mock* foram utilizados como controle. O título está expresso em Log<sub>10</sub>. (n = 5 ou 6). Barras = mediana. Teste estatístico de Mann – Whitney. (\* p < 0,0317; \*\*p < 0,0079).

#### 4.1.5. Detecção por imunohistoquímica de antígeno viral no cérebro e cerebelo dos animais infectados

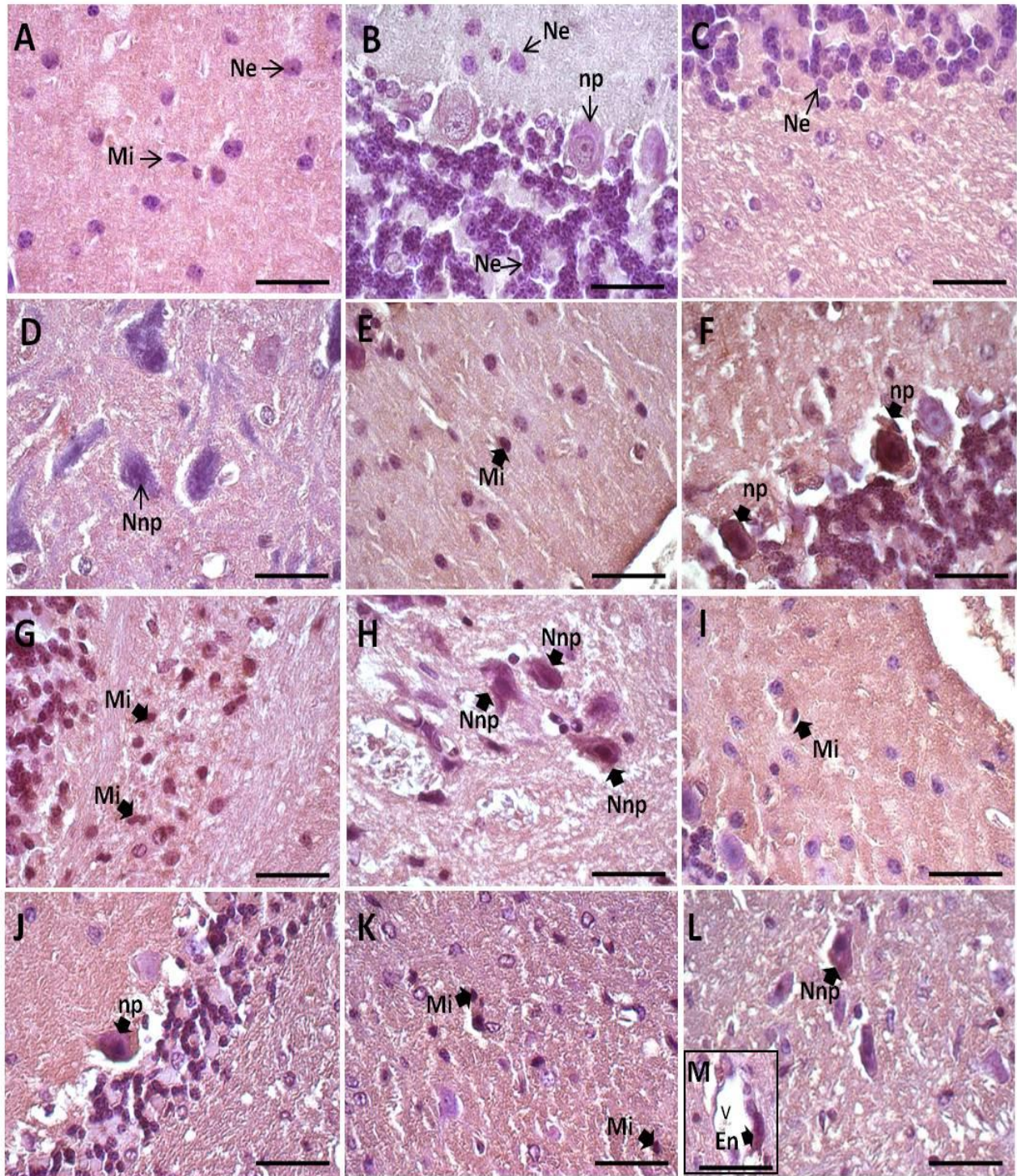
Com intuito de investigar a presença de replicação viral no tecido nervoso, foram realizados ensaios de imunohistoquímica para detecção da proteína NS3 de DENV2. Como esta proteína não está presente na partícula viral, ela pode ser utilizada como um indicativo

de replicação. Foram analisados cortes histológicos do 1<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> d.p.i., e do 7<sup>o</sup> dia após a inoculação com o *mock*. A proteína NS3 foi detectada em diferentes células das camadas do cérebro e do cerebelo dos camundongos infectados, enquanto que no controle *mock* não houve reação positiva (Figura 4.8). Nos tecidos dos animais infectados incubados somente com o anticorpo secundário também não houve marcações inespecíficas (dados não mostrados). No início e no final da cinética, o antígeno viral foi detectado no tecido cerebral em células que revestem a pia-máter, assim como no infiltrado de células mononucleares nela presentes (Figura 4.8 E e K); em neurônios e microglia na camada molecular (Figura 4.8 F e L); em neurônios, células endoteliais, microglia e células mononucleares na camada piramidal (Figura 4.8 G, H, I, M e N); e também em microglia na substância branca (Figura 4.8 J e O). No tecido cerebelar a NS3 foi detectada em microglia na camada molecular (Figura 4.9 E e I), em alguns neurônios de Purkinje (Figura 4.9 F e J), em microglia e células mononucleares na substância branca (Figura 4.9 G e K) e também em microglia e neurônios multipolares do núcleo profundo do cerebelo (Figura 4.9 H e L), tanto no 1<sup>o</sup> d.p.i. quanto no 10<sup>o</sup> d.p.i. No último dia da cinética, o antígeno também pôde ser detectado em células endoteliais dos vasos (Figura 4.9 M). Sendo assim, pode-se concluir que o DENV2 NGC inoculado por via i.c nos camundongos BALB/c foi capaz de replicar em diferentes tipos celulares no tecido nervoso, tais como: neurônios, microglia, infiltrado mononuclear e em células endoteliais.



**Figura 4.8: Detecção da proteína NS3 no tecido cerebral de camundongos BALB/c infectados com DENV2.** Os cortes foram incubados com anticorpo policlonal anti-NS3 e com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase. Camundongo inoculado somente com *mock* (A - D); Detecção da proteína NS3 em células que revestem a pia-máter e em neurônios, células microgliais, mononucleares e endoteliais das regiões da pia-máter, córtex e substância branca, nos animais infectados com DENV2 no 1<sup>o</sup> d.p.i. (E - J) e 10<sup>o</sup> d.p.i. (K - O). Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris. Seta preta larga - proteína NS3 marcada. pm - pia - máter; v - vaso sanguíneo; Mi - microglia; Ne - neurônio; En - endotélio; im - infiltrado mononuclear. Barras = 20µm.





**Figura 4.9: Detecção da proteína NS3 no tecido cerebelar de camundongos BALB/c infectados com DENV2.** Os cortes foram incubados como descrito na figura 4.8. Camundongo inoculado somente com *mock* (A - D); Detecção da proteína NS3 em neurônios e células microgliais e endoteliais no córtex e na substância branca, no 1<sup>o</sup> (E - H) e 10<sup>o</sup> d.p.i. (I - M). Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris. Seta preta larga - proteína NS3 marcada. Mi - microglia; Ne - neurônio; Nnp- neurônio multipolar do núcleo profundo; np - neurônio de Purkinje; En - endotélio; v - vaso sanguíneo. Barras= 20 µm.

#### 4.1.6. Detecção de partículas infecciosas de DENV2 na circulação

A presença de partículas virais infecciosas também foi detectada no soro dos animais infectados, através de ensaios de plaque em células Vero. Entretanto, não foi possível calcular a titulação do vírus, provavelmente devido à baixa incidência deste. Sendo assim, os resultados foram apresentados quanto à detecção ou não de plaque viral (Tabela 4.1). Notamos a presença de vírus desde o início do estudo (1<sup>o</sup> d.p.i.), com 1 animal positivo dentre 5 inoculados (20%). Posteriormente, observamos um aumento da proporção do número de animais positivos ao longo da cinética de infecção, até atingir um percentual de 71% nos pontos finais (9<sup>o</sup> - 10<sup>o</sup> d.p.i.). Conforme o esperado, no material proveniente grupo controle (*mock*) não foi observada a formação de plaque.

	<b>Mock</b>	<b>1 d.p.i.</b>	<b>3 d.p.i.</b>	<b>5 d.p.i.</b>	<b>7 d.p.i.</b>	<b>9-10 d.p.i.</b>
<b>NÚMERO DE ANIMAIS</b>	0(5)	+ 1(5)	++ 2(5)	+++ 3(5)	++ 2(5)	+++++ 5(7)

**Tabela 4.1: Detecção de partículas virais infecciosas no soro dos camundongos BALB/c inoculados com DENV2.** Os soros dos animais foram coletados nos diferentes dias após a infecção para a detecção qualitativa de DENV2, evidenciada por ensaio de plaque em células Vero. Os valores representam o número de animais positivos dentre o número total de camundongos avaliados (entre parênteses). n = 5 a 7.

#### 4.1.7. Histopatologia do fígado dos camundongos infectados

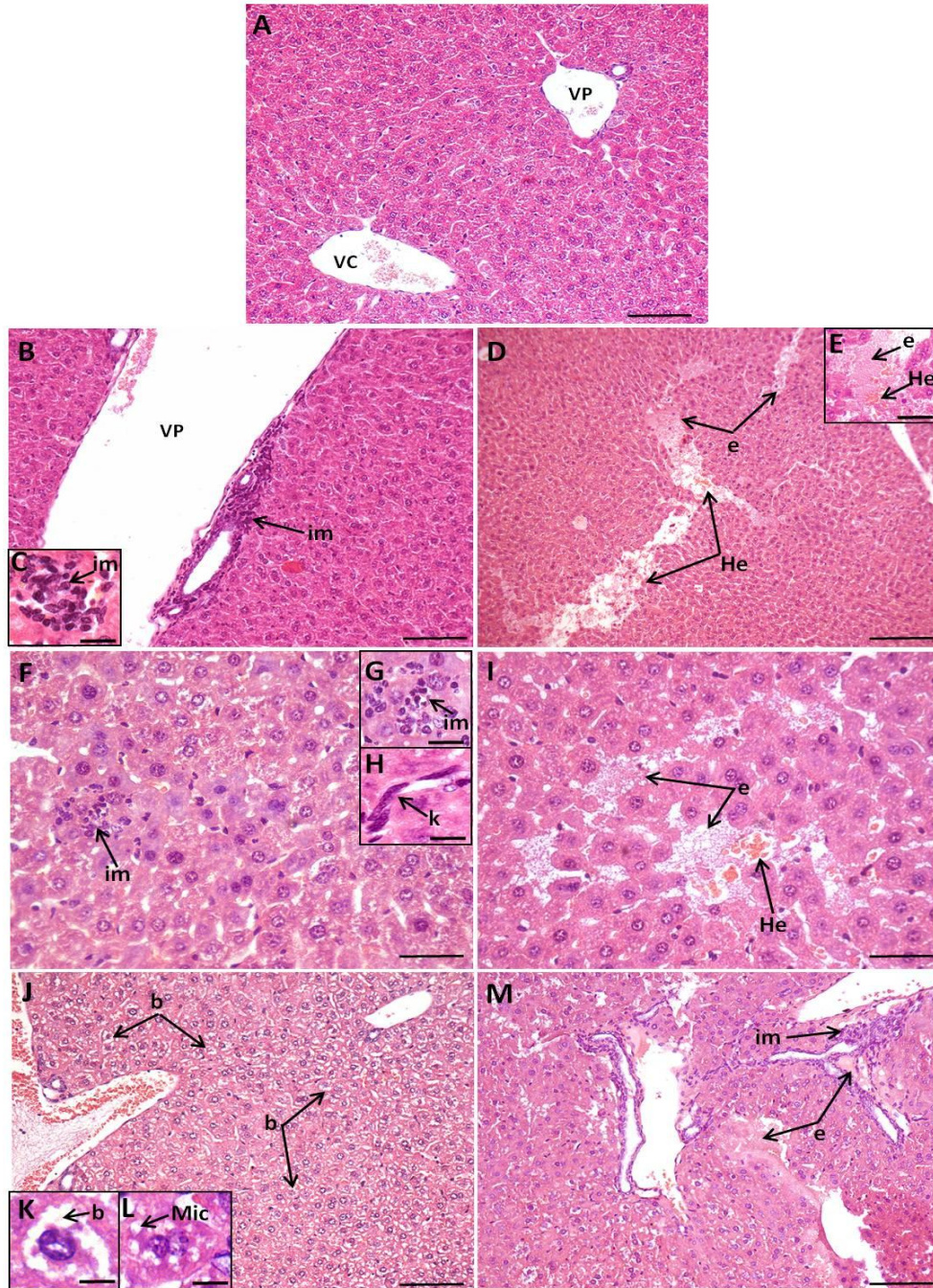
As análises histopatológicas no tecido hepático foram realizadas 1, 3, 5, 7 e 10 dias após infecção em camundongos infectados com DENV2 e no 7<sup>o</sup> dia após a inoculação do *mock* em camundongos controle.

Como esperado, os animais inoculados somente com *mock* apresentaram um tecido hepático com o parênquima íntegro e sem alterações circulatórias (Figura 4.10 A e 4.11 A). Por outro lado, foi observada a presença de alterações histopatológicas (Figura 11 B-N) no fígado dos camundongos infectados com DENV2 no decorrer da cinética. Logo no 1<sup>o</sup> d.p.i.,

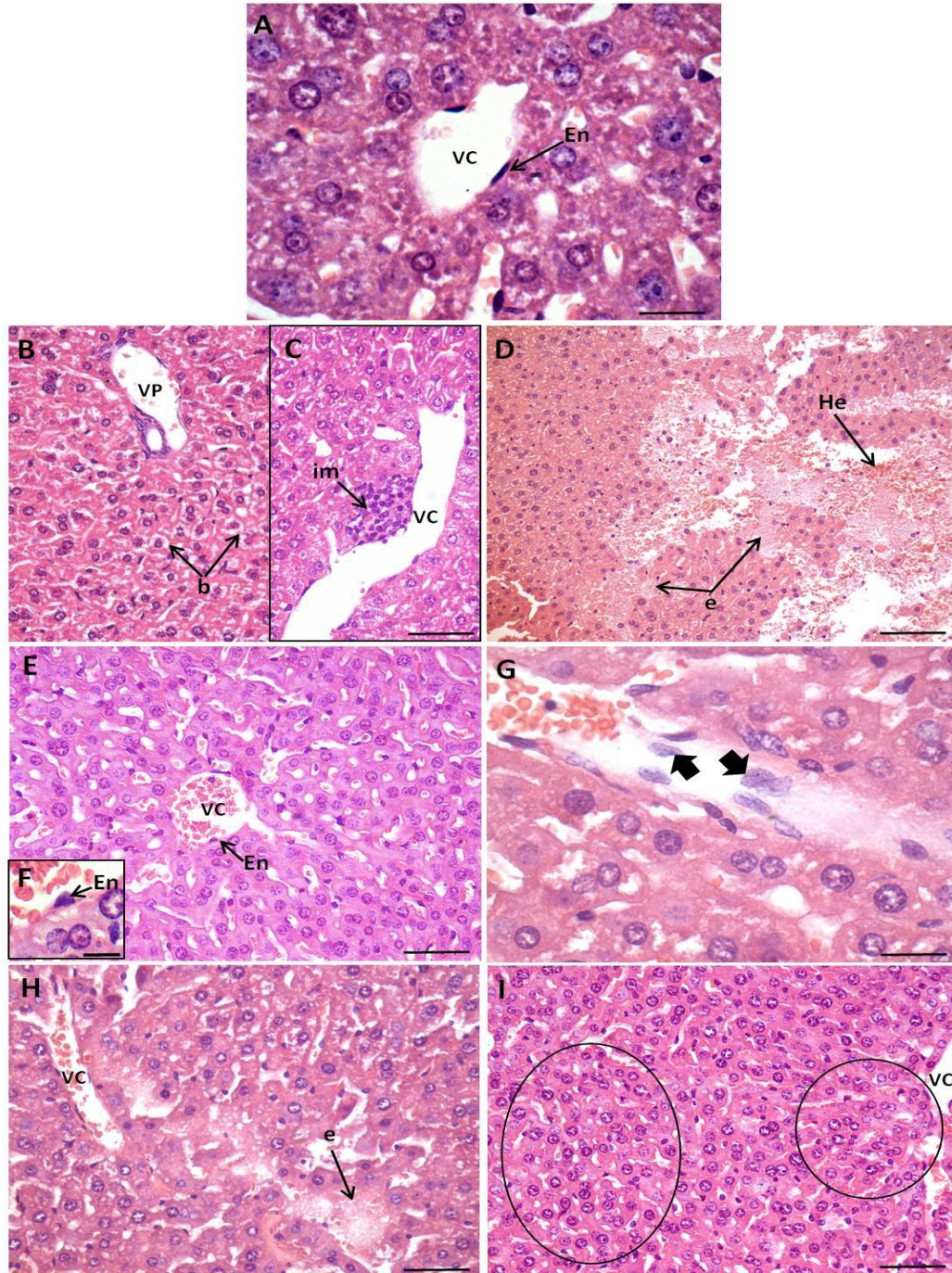
o tecido hepático já se mostrou alterado, com infiltrados mononucleares (Figura 4.10 B, C), edema e hemorragia (Figura 4.10 D e E), tanto em regiões perivasculares quanto distribuído no parênquima. Vale ressaltar que os animais observados no primeiro dia da cinética apresentaram mais lesões circulatórias do que nos tempos seguintes (Figura 4.12 A e B). No 3<sup>o</sup> d.p.i. as lesões do tecido hepático se mostraram semelhante ao observado no 1<sup>o</sup> dia, com áreas com infiltrados mononucleares (Figura 4.10 F e G), hemorragia e edema (Figura 4.10 I). Em um tempo mais tardio da cinética, no 5<sup>o</sup> d.p.i., pudemos observar que houve uma progressão nas lesões de parênquima, com maior presença de balonização e de microesteatose hepatocitária, principalmente ao redor do espaço porta (Figura 4.10 J - L e 4.12 C). Houve também uma regressão dos danos circulatórios (edema e hemorragia), mas esses ainda se fizeram presentes pelo parênquima hepático (Figura 4.12 A e B). Além disso, o tecido apresentou infiltrados mononucleares ao redor dos vasos e também distribuídos pelo parênquima (Figura 4.10 M). No 7<sup>o</sup> d.p.i., os camundongos apresentaram o mesmo padrão de lesões hepáticas do 5<sup>o</sup> dia, como balonização hepatocitária, edema e hemorragia (Figura 4.11 B e D, respectivamente), e a presença de infiltrados mononucleares (Figura 4.11 C).

Por fim, as alterações hepáticas nos animais infectados no 10<sup>o</sup> d.p.i. foram discretas. Observamos alguns infiltrados mononucleares, tumefação de células endoteliais (Figura 4.11 E e F), áreas focais de edema (Figura 4.11 H) e o aparecimento de células mononucleares nos vasos (Figura 4.11 G). Neste ponto da cinética, observamos poliploidia hepatocitária (Figura 4.11 I), sugerindo um processo de regeneração do parênquima. Vale à pena destacar que, do início ao fim da cinética, foi observada uma hiperplasia e hipertrofia de células de Kupffer (Figura 4.10 H).

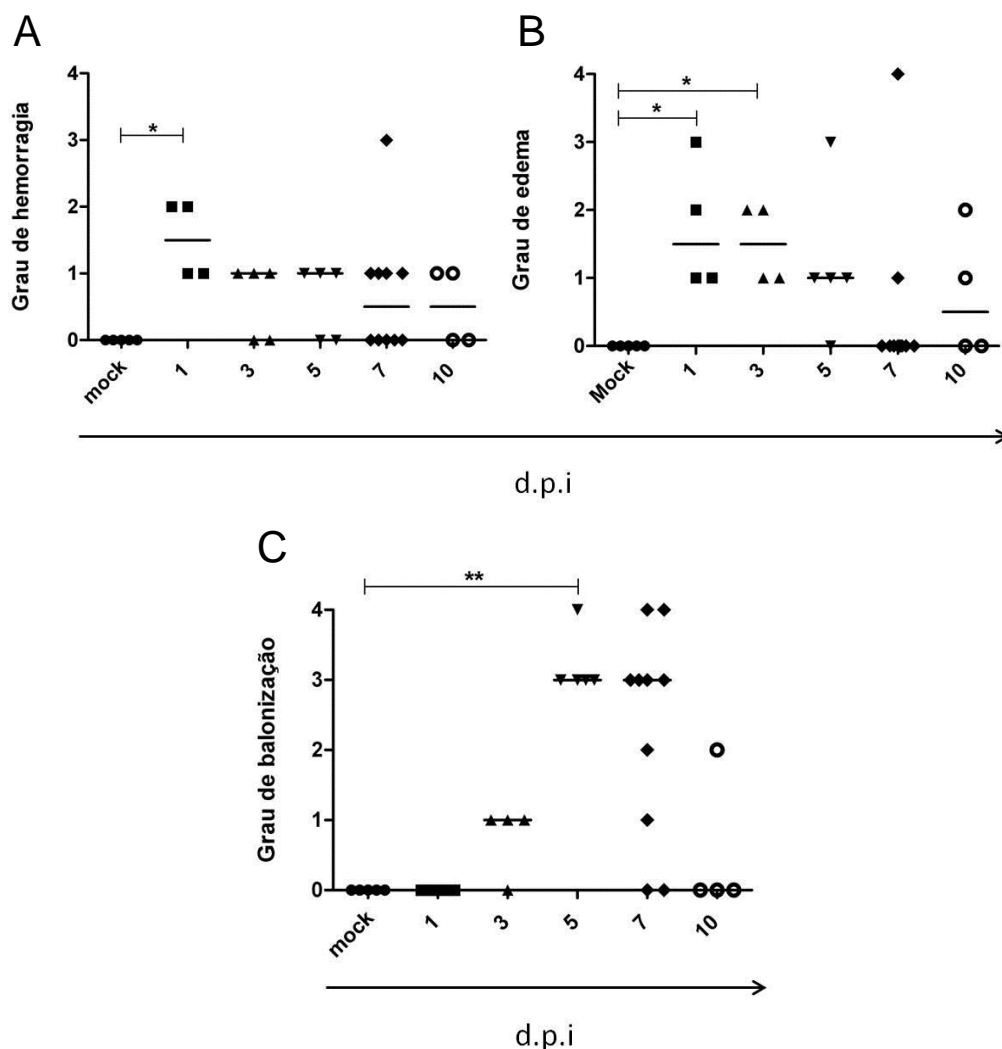
De um modo geral, em uma análise semiquantitativa das lesões no tecido hepático dos animais infectados, observamos que os danos circulatórios apareceram mais cedo, logo após a infecção, e os danos de parênquima começaram a surgir de forma mais tardia, a partir do 3<sup>o</sup> d.p.i. Entretanto, tais danos de parênquima foram transitórios, uma vez que detectamos um indicativo de regeneração no final da cinética de infecção. Também observamos que o número de infiltrados mononucleares diminuiu consideravelmente no final da cinética.



**Figura 4.10: Aspectos histopatológicos do tecido hepático em camundongos BALB/c infectados (1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> d.p.i.) com DENV2 ou inoculados com *mock*. Camundongos inoculados com *mock* (A); Animais infectados com DENV2 apresentando células de Kupffer hiperplásicas no decorrer de toda a cinética (H). Animal no 1<sup>o</sup> d.p.i. exibindo infiltrado mononuclear em torno de vasos do espaço porta e no parênquima (B e C), edema e hemorragia (D e E); Animais no 3<sup>o</sup> d.p.i., demonstrando também infiltrados mononucleares (F e G), edema e hemorragia (I); Camundongos no 5<sup>o</sup> d.p.i. mostrando o aparecimento de balonização hepatocitária (J e K) e microesteatose (J e L) ao redor do espaço porta, e regiões com edemas e hemorragias detectadas em menores quantidades (M). VP - veia porta; VC - veia centrolobular; B - balonização hepatocitária; Mic - microesteatose; e - edema; He - hemorragia; im - infiltrado mononuclear. Os cortes foram corados com H.E. e visualizados em microscopia óptica. Barras= 200 μm (D) 100μm (A, B, J, M); a 50μm (E, I, F) e a 20 μm (C, G, H, K, L).**



**Figura 4.11: Aspectos histopatológicos do tecido hepático em camundongos BALB/c infectados (7<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> d.p.i.) com DENV2 ou inoculados com *mock*. Camundongos inoculados com *mock*, mostrando tecido com aspecto preservado e células endoteliais não tumefeitas (A); Animais infectados com DENV2 no 7<sup>o</sup> d.p.i. exibindo balonização periportal (B), poucos infiltrados mononucleares ao redor do espaço porta (C), edema e hemorragia (D); Animais no 10<sup>o</sup> d.p.i., com células endoteliais tumefeitas nos vasos (E e F), aparecimento de células mononucleares não identificadas nos vasos (G), alguns focos de edema (H) e o parênquima regenerado com poliploidia (I). VP - veia porta; VC – veia centrolobular; En - célula endotelial tumefeita; B - balonização hepatocitária; E - edema; He – hemorragia; seta preta larga – células mononucleares não identificadas; im - infiltrado mononuclear; Círculo preto - poliploidia hepatocitária. Barras= 100µm (D); 50µm (A, B, C, I, E, H) e 20 µm (F, G).**



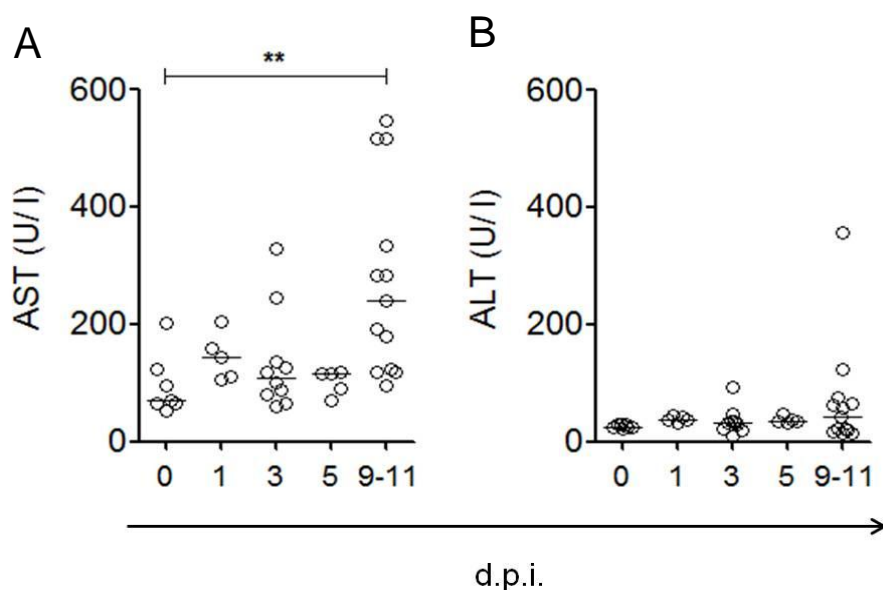
**Figura 4.12: Quantificação das alterações no tecido hepático dos camundongos infectados e do grupo *mock*.** Foram atribuídos graus utilizando uma escala subjetiva de 0 a 4 para as diferentes alterações. Alterações circulatórias: 0 = ausência, 1 = leve e focal, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = difuso. Balonização hepatocitária, foram atribuídos os valores: 0 = ausência, 1 = áreas focais, 2 = áreas focais periportais, 3 = áreas extensas periportais, 4= difusa. (n = 4 a 10). Barras = mediana. Teste estatístico de Mann-Whitney (\*p < 0,016); \*\*p < 0,008).

A mesma tentativa de detecção do DENV2, que foi realizada no cérebro/cerebelo, foi também feita em amostras de fígado. Os macerados dos tecidos hepático derivados dos animais infectados, em todos os pontos da cinética, foram testados para a detecção de plaque em camada de células Vero. Contudo, não foi observada a formação de plaque viral. Isso pode ser explicado pelo número reduzido de partículas virais neste tecido.

#### 4.1.8. Detecção dos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST

Os níveis séricos das enzimas alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) nos animais foram analisados nos diferentes pontos da cinética da infecção com DENV2 (Figura 4.13 A e B).

Nos pontos finais da cinética, 9-11 d.p.i., observamos que os camundongos infectados com DENV2 apresentaram um aumento significativo nos níveis de AST em relação aos camundongos não infectados (*naïve*) (Figura 4.13 A). Os níveis séricos de ALT se mostraram um pouco mais elevados nos pontos finais da cinética em alguns animais, contudo este aumento não foi significativo (Figura 4.13 B).



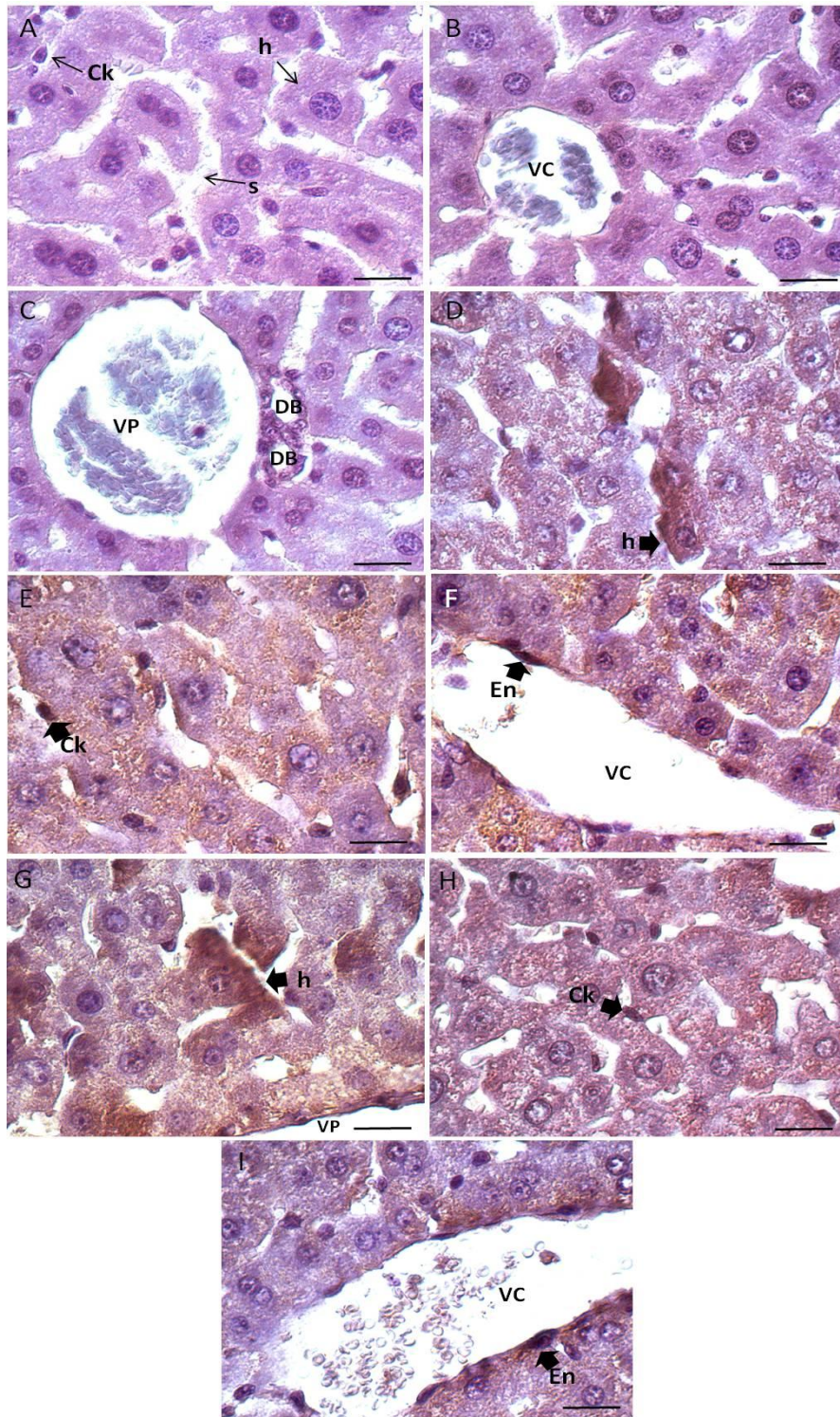
**Figura 4.13:** Níveis séricos das enzimas AST (A) e ALT (B) dos animais infectados com DENV2. (n = 5 a 10). Barras = mediana. Teste estatístico de Mann – Whitney. (\*\*p < 0,005).

#### 4.1.9. Detecção de antígenos virais por imunohistoquímica no tecido hepático dos camundongos infectados

Para investigar a presença do vírus no fígado foram realizados ensaios de imunohistoquímica para a detecção da proteína NS3, utilizando o tecido hepático dos camundongos inoculados com o DENV2 no início e no fim da cinética de infecção (1<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> d.p.i.). Como controle foram usados os animais no 7<sup>o</sup> dia após a inoculação com o *mock*,

sem a presença de marcação (Figura 4.14 A, B e C). Além disso, utilizamos como controle do ensaio os tecidos de animais inoculados com o vírus e incubados apenas com o anticorpo secundário. Nestes testes também não foram observadas marcações positivas (dados não mostrados). No tecido dos animais infectados com DENV2 foram detectadas marcações da NS3 em hepatócitos (Figura 4.14 D e H), células de Kupffer (Figura 4.14 E e G) e células endoteliais (Figura 4.14 F e I) no 1<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> d.p.i. A detecção de NS3 (uma proteína não-estrutural de DENV) indica que houve replicação viral nesse tecido. Portanto, esses resultados sugerem que a infecção por via i.c não só leva a replicação no sistema nervoso central, mais também em outros sítios periféricos, como no fígado.



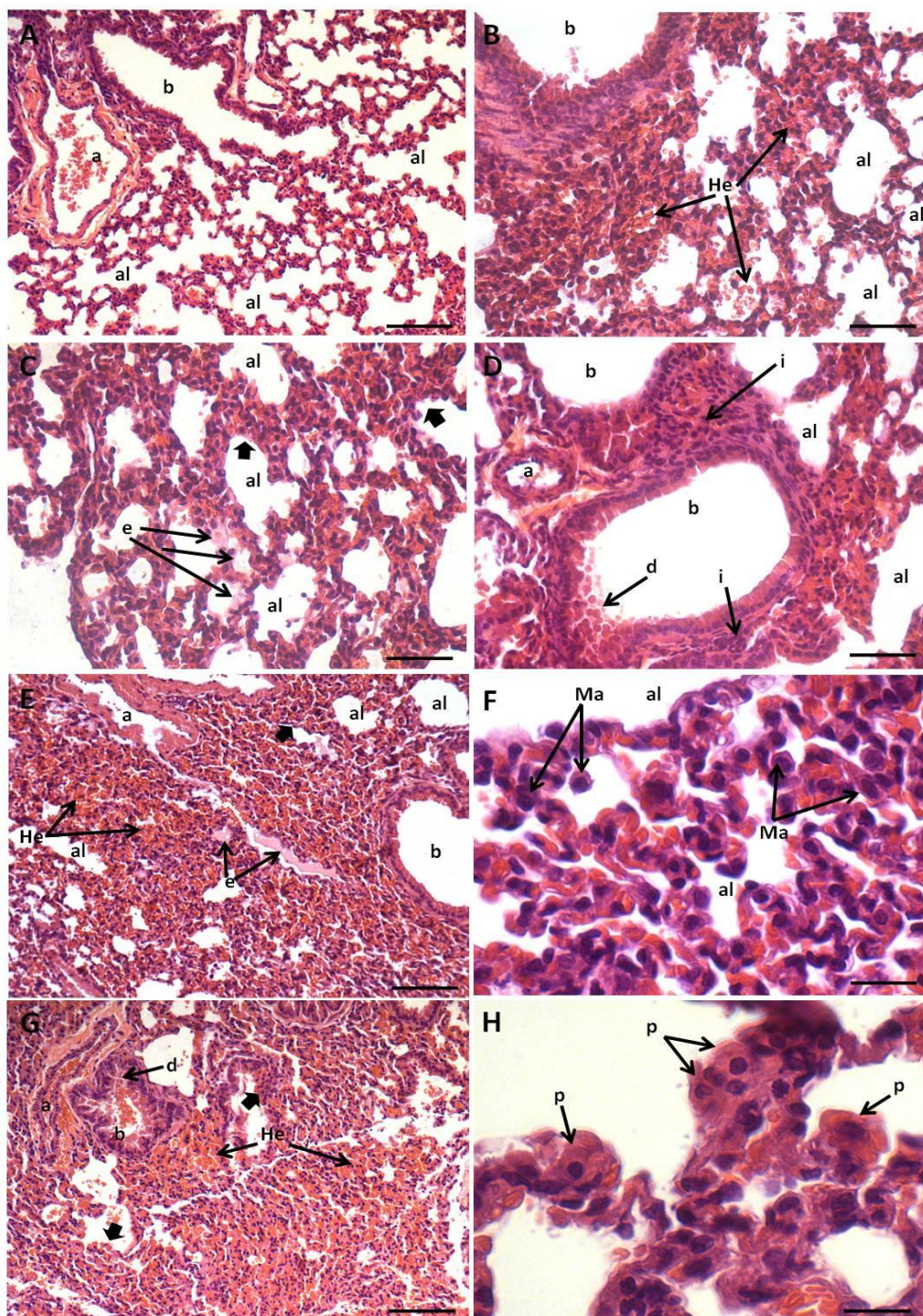


**Figura 4.14: Detecção da proteína NS3 no tecido hepático de camundongos BALB/c infectados com DENV2 no 1<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> d.p.i..** Camundongo somente inoculado com *mock* (A - C); Tecido hepático de animais infectados com DENV2 no 1<sup>o</sup> (D - F) e 10<sup>o</sup> (G - I) d.p.i., com detecções do antígeno viral em hepatócitos (D e H), células de Kupffer (E e G) e células endoteliais (F e I). Os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Harris. Seta preta- proteína NS3 marcada; h - hepatócitos; En - endotélio; ck - célula de Kupffer; VP - veia portal; VC - veia centrolobular; DB - ducto biliar. Barras= 20 μm.

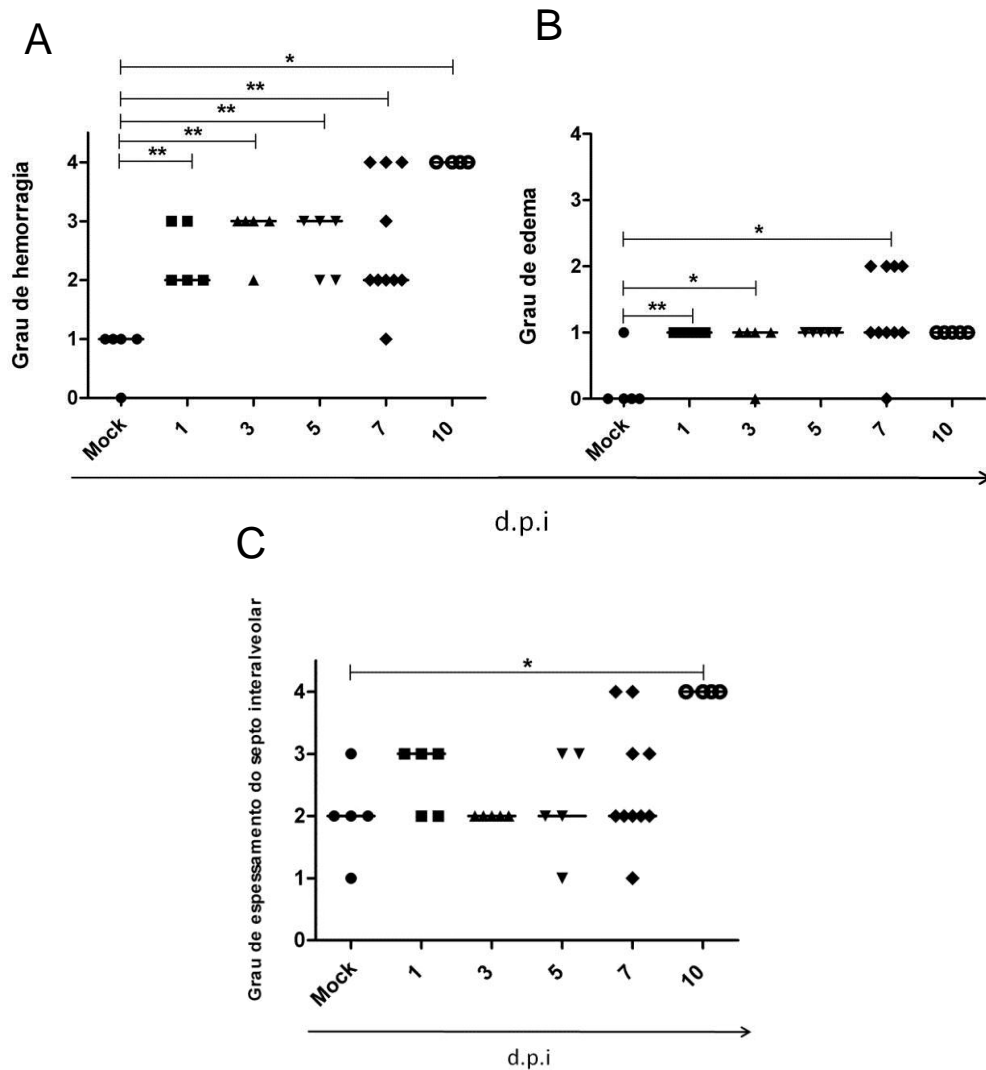
#### **4.1.10. Análises histológicas do tecido pulmonar dos camundongos infectados com DENV2**

O tecido pulmonar dos camundongos inoculados com DENV2 também foi analisado nos vários pontos da cinética de infecção. Os animais controles inoculados somente com o *mock* foram analisados no 7<sup>o</sup> dia após o inóculo. Conforme o esperado, o grupo de animais que recebeu o *mock* não apresentou nenhuma alteração histopatológica no tecido pulmonar (Figura 4.15 A). Os camundongos inoculados com DENV2 apresentaram lesões circulatórias, como hemorragia e edema, além de descamação do epitélio bronquiolar, espessamento de septo, infiltrado peribronquiolar, presença de macrófagos alveolares e hipertrofia de pneumócito do tipo II, detectadas desde o início até o final da cinética. No 1<sup>o</sup> d.p.i. foram encontradas áreas discretas de hemorragia e edema nos alvéolos (Figura 4.15 B e C). Apesar dos infiltrados peribronquiolares terem sido observados em todos os tempo da cinética, a partir do 3<sup>o</sup> d.p.i. eles se tornaram mais presentes no tecido (Figura 4.15 D). No 7<sup>o</sup> d.p.i. foi observado um edema mais intenso, presente de modo mais difuso em diversas áreas (grau 2), A quantificação deste dano se mostrou estatisticamente significativa em todos os tempos da cinética quando comparado com os animais controles (Figura 4.15 E e 4.16 B). No 7<sup>o</sup> d.p.i. também foi observado um aumento dos danos hemorrágicos e do espessamento dos septos interalveolares, atingindo o grau máximo no 10<sup>o</sup> d.p.i. no caso da hemorragia (Figuras 4.15 E e G, 4.16 A e C). A hemorragia apresentou significância estatística durante todos os dias da cinética, com gravidade variando entre os graus 2 a 4, enquanto que o espessamento dos septos só apresentou diferença estatisticamente significativa no 10<sup>o</sup> d.p.i. (Figuras 4.16 A e 4.16 C). Nos animais *mock* também observamos espessamento dos septos alveolares de grau 2 na sua maioria (Figura 4.16 C). Em todos os tempos, nos animais infectados foi observada descamação do epitélio bronquiolar em graus variados de intensidade, com maior gravidade no 10<sup>o</sup> d.p.i. (Figura 4.15 G). Vale ressaltar que os pneumócitos de tipo II hipertrofiados se encontravam presentes em todos os dias após a infecção viral (Figura 4.15 H). O final da infecção também foi marcado por uma maior quantidade de macrófagos livres pelos alvéolos e no septo interalveolar (Figura 4.15 F).

Resumidamente, todas as alterações decorrentes da infecção com DENV2 foram encontradas em todo decorrer da cinética. Todavia, a partir do 3<sup>o</sup> d.p.i. e no 7<sup>o</sup> d.p.i. houve um aumento dos infiltrados peribronquiolares e do edema alveolar, respectivamente. No final da cinética, as alterações no tecido pulmonar, danos hemorrágicos, descamação do epitélio bronquiolar e espessamento dos septos interalveolares, se mostraram mais graves, além dos animais apresentarem maior incidência de macrófagos por todo o tecido.



**Figura 4.15: Aspectos histopatológicos do tecido pulmonar em camundongos BALB/c infectados com DENV2 ou inoculados com *mock*.** Camundongos inoculados com *mock* (A); Animais infectados com DENV2, no 1<sup>o</sup> d.p.i., exibindo áreas discretas de hemorragias nos alvéolos (B), espessamento dos septos interalveolares e edema (C). Animal no 3<sup>o</sup> d.p.i. apresentando descamação do epitélio bronquiolar e o aumento do infiltrado peribronquiolar (D). Camundongos no 7<sup>o</sup> d.p.i. com áreas mais difusas de hemorragia, edema e espessamento de septo (E) e no 10<sup>o</sup> d.p.i. exibindo um aumento do número de macrófagos (F), áreas mais extensas de hemorragia e descamação do epitélio bronquiolar (G). Durante toda a cinética foi observada a hipertrofia de pneumócitos tipo II (H). b – bronquíolo; a – arteríola; al – alvéolo; He – hemorragia; e – edema; Ma – macrófago alveolar; d – descamação do epitélio bronquiolar; p – pneumócito tipo II; seta preta larga – espessamento do septo interalveolar. Barras= 100µm (A, E, G); 50µm (B, C, D) e 20 µm (F e G).



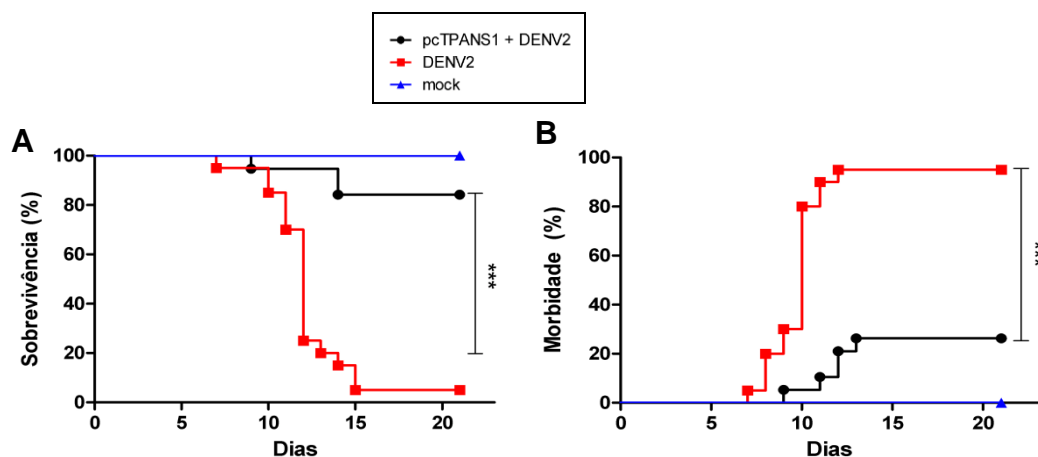
**Figura 4.16: Quantificação das alterações no tecido pulmonar dos camundongos infectados e do grupo *mock*.** Foram atribuídos graus utilizando uma escala subjetiva de 0 a 4 para as diferentes alterações. Alterações circulatórias e espessamento dos septos interalveolares: 0 = ausência, 1 = leve e focal, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = difuso. Teste estatístico de Mann-Whitney (\* $p < 0,046$ ; \*\*  $p < 0,0098$ ). (n = 4 a 10). Barras = mediana.

Além das análises histopatológicas, também foram realizados ensaios para a detecção de partículas infecciosas de DENV2 no tecido pulmonar utilizando células Vero. Apenas 1 animal se mostrou positivo para a presença do vírus no 1<sup>o</sup> d.p.i., 3 animais no 5<sup>o</sup> d.p.i. e 2 animais no 10<sup>o</sup> d.p.i. Tais resultados sugerem a ocorrência de replicação viral no pulmão, embora em pequena magnitude.

## 4.2. Camundongos vacinados com o pcTPANS1 e desafiados com DENV2

### 4.2.1. Sobrevivência e morbidade dos animais imunizados e desafiados

Após a inoculação de uma dose letal de DENV2 em camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1, tanto a sobrevivência quanto a morbidade foram acompanhadas nos diferentes pontos da cinética, 1 à 21 dias d.p.i. Como esperado o grupo de animais controle (*mock*) apresentou 100% de sobrevivência. Já no grupo de camundongos somente infectados com o DENV2 houve um número elevado de morte, sendo que apenas 5% dos animais sobreviveram. Em contrapartida, os animais que receberam as duas doses da vacina pcTPANS1 e foram desafiados com o vírus demonstraram que as imunizações protegeram os camundongos, com um percentual de 84% de sobrevivência, significativamente superior ao dos camundongos somente infectados com DENV2 (Figura 4.17A). Na análise da morbidade, levou-se em conta o comprometimento da coluna vertebral e paralisia de membros inferiores e/ou posteriores, precedendo ou não à morte. Os animais *mock* não mostraram nenhum sinal de morbidade. O grupo de animais somente infectados com DENV2 apresentou 95% de morbidade, enquanto que o grupo dos camundongos imunizados e desafiados apresentou um percentual significativamente menor, 26,3%, demonstrando mais uma vez o papel protetor da vacina pcTPANS1 (Figura 4.17B).



**Figura 4.17: Susceptibilidade de camundongos vacinados ou não à infecção com DENV2.** Curvas de sobrevivência (A) e morbidade (B) dos camundongos BALB/c vacinados ou não previamente com o pcTPANS1 e acompanhados por 21 dias após a inoculação viral pela via i.c. O grupo controle recebeu apenas a inoculação do *Mock* por via i.c. Os dados representam a compilação de dois experimentos independentes com grupos de 9 a 10 animais em cada teste. Teste estatístico Long – Rank. (\*\*\*) p < 0,0001).

#### **4.2.2. Análises histológicas do cérebro e cerebelo dos camundongos imunizados com pcTPANS1**

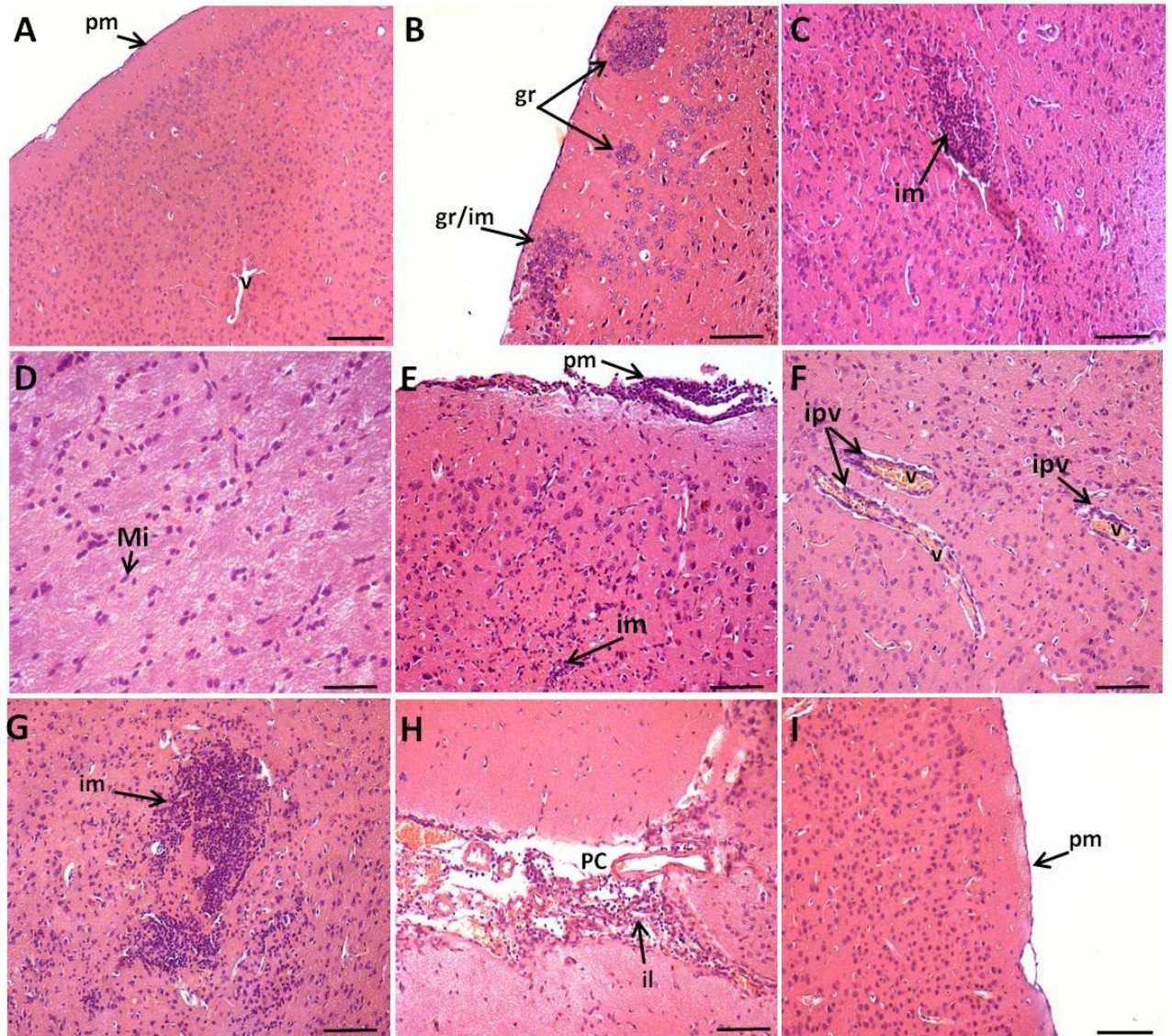
Para avaliar o que ocorre com os tecidos cerebral e cerebelar em camundongos infectados com o DENV2 após a imunização com a vacina pcTPANS1, o tecido nervoso destes animais foi analisado no 1<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias após o desafio viral. No 1<sup>o</sup> dia após o desafio, o tecido cerebral dos animais imunizados estava mais preservado, quando comparado aos animais somente infectados, sem apresentar áreas de lesões circulatorias (Figura 4.18 A, 4.19 A, 4.19 B). Além disso, a pia-máter não apresentou os infiltrados que apareceram nos camundongos não vacinados (Figura 4.18 A e 4.19 C). Mesmo assim, foram observados focos de gliose reacional acompanhados ou não de infiltrados (Figura 4.18 B e C) e a substância branca apresentou um número maior de microglia (Figura 4.18 D). Tais efeitos também estavam presentes nos animais não imunizados. No cerebelo, diferente do observado nos animais somente infectados, a pia-máter dos camundongos vacinados não apresentou infiltrados (Figura 4.20 A), mas a substância branca continuou a conter muita microglia (Figura 4.20 B).

No 11<sup>o</sup> dia, em comparação aos camundongos somente infectados, o cérebro dos animais vacinados se mostrou mais preservado, com focos de hemorragia muito reduzidos e o edema permaneceu quase inaparente (Figura 4.18 I, 4.19 A, 4.19 B). Em relação aos infiltrados na pia-máter (Figura 4.18 E), perivascularares (Figura 4.18 F) e no plexo coróide (Figura 4.18 H), hiperplasia de microglia (Figura 4.18 E) e gliose reacional (Figura 4.18 G) no córtex cerebral, todos estes parâmetros ainda continuaram a ser observados no 11<sup>o</sup> d.p.i. Embora a intensidade dos infiltrados da pia-máter e ao redor dos vasos tenha sido inferior nos animais vacinados (Figura 4.19 C e D), o número de microglia distribuídas pelo córtex e de focos de gliose reativa pareceu ser maior do que no tecido dos animais que não receberam a vacina (Figura 4.18 E e G). Além disso, no final da cinética, o córtex dos camundongos vacinados apresentou um infiltrado bem difuso, que não foi observado no 1<sup>o</sup> dia após o desafio assim como nos animais que não foram imunizados (Figura 4.18 E). Já no tecido cerebelar, houve um aumento do infiltrado na pia-máter em comparação ao início da cinética (Figura 4.20 C), entretanto, tal aumento foi similar ao observado nos camundongos somente infectados (Figura 4.20 E). O infiltrado perivascular no final da

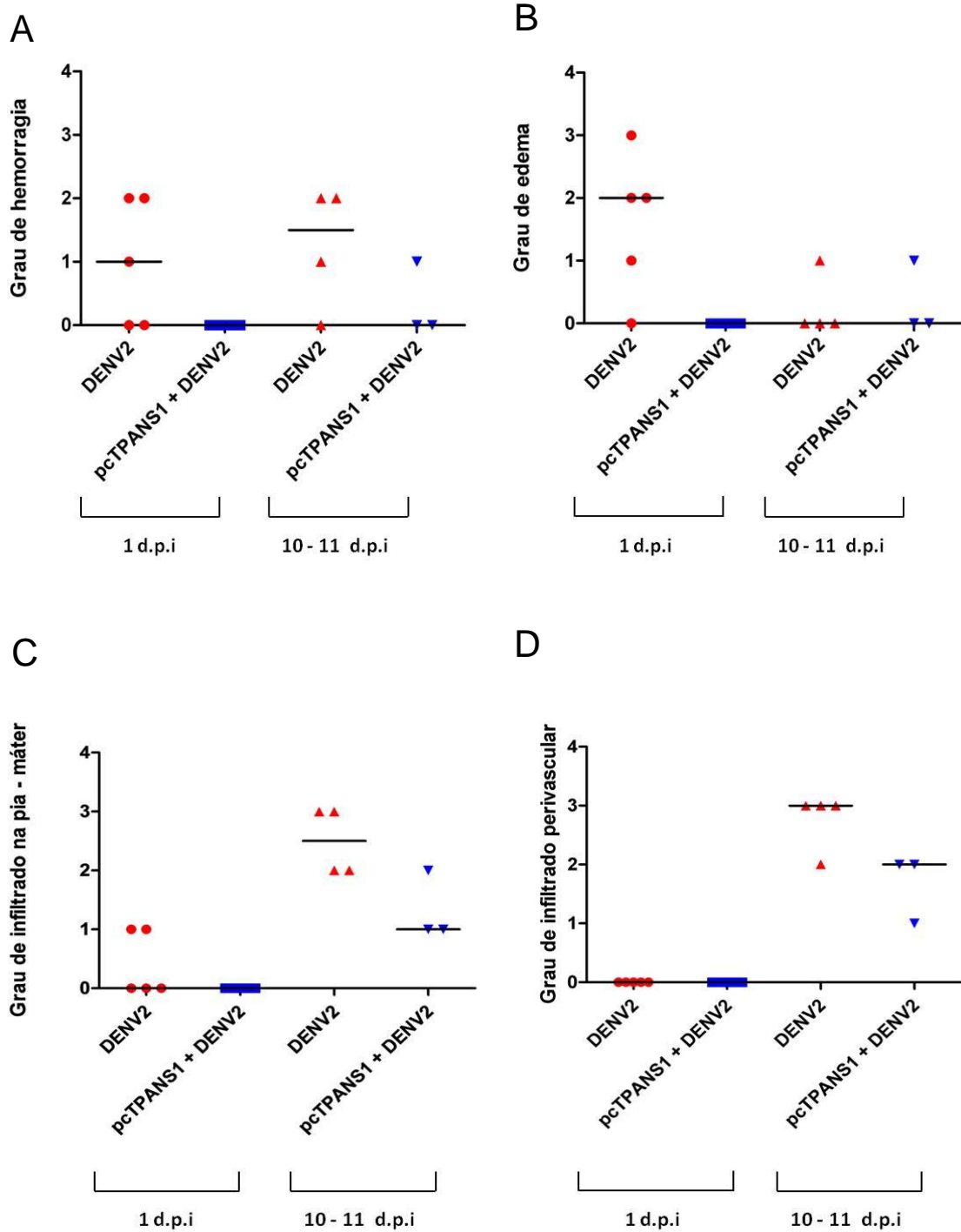
cinética se mostrou um pouco mais intenso nos animais vacinados (Figura 4.20 D) com ausência de alterações circulatórias.

Em resumo, no início da cinética os animais vacinados apresentaram algumas alterações no tecido cerebral similares aos camundongos somente infectados. Entretanto, o edema, a hemorragia e o infiltrado na pia-máter foram inexistentes, mostrando que a imunização promove um efeito protetor logo no 1<sup>o</sup> dia após o desafio. Além disso, no final da cinética o tecido dos animais imunizados apresentou alterações circulatórias bem reduzidas. Houve uma diminuição dos infiltrados perivasculares e na pia-máter, enquanto que o número de microglia e os focos de gliose reacional no córtex pareceram aumentar. Surgiu ainda um infiltrado difuso nas camadas do córtex cerebral. Portanto, os resultados sugerem que no final da cinética houve a amplificação de uma forte resposta celular no tecido cerebral, aparentemente protetora, com a redução das lesões. No cerebelo dos animais imunizados e desafiados, no início da cinética a pia-máter não se mostrou espessada com infiltrado e foi detectada muita microglia distribuída pela substância branca. Além disso, a presença de infiltrado no cerebelo dos animais vacinados no final da cinética e a ausência de danos circulatórios corroboram com o observado no cérebro.

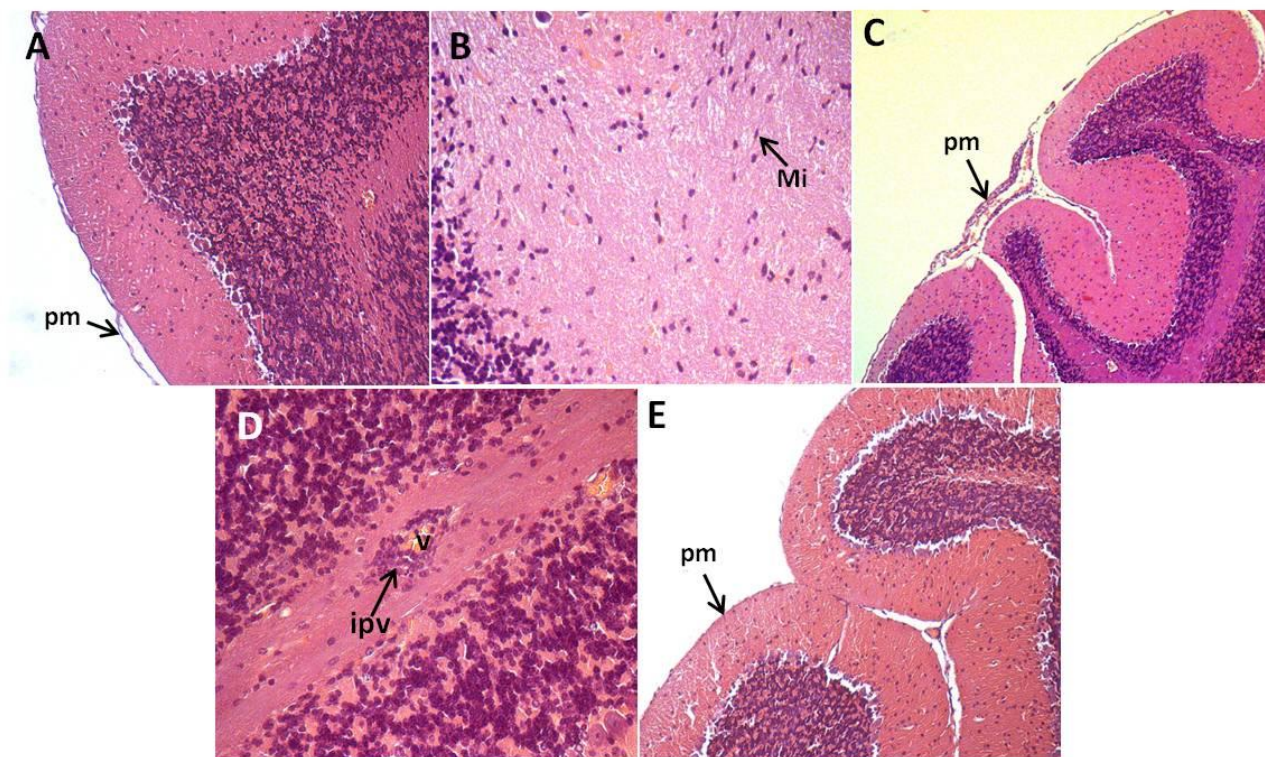




**Figura 4.18: Aspectos histopatológicos do tecido cerebral em camundongos BALB/c imunizados com o pcTPANS1 e desafiados com DENV2.** Animais vacinados e desafiados no 1<sup>o</sup> d.p.i. exibindo: ausência de espessamento da pia-máter e alterações circulatórias (A); gliose reacional na região mais externa do córtex cerebral (camada molecular) (B); focos de gliose reacional acompanhados de infiltrado mononuclear na região mais interna (camada de neurônios piramidais) (C); hiperplasia de microglia na substância branca (D). Animais vacinados no 10<sup>o</sup> d.p.i. exibindo: infiltrado mononuclear ao redor dos vasos da pia-máter e células mononucleares difusas pelas camadas do córtex (E); focos de infiltrados perivascularres (F), nos plexos coróides (H) e de infiltrado mononuclear no córtex (G), apesar da preservação de algumas áreas do tecido cerebral (I). pm – pia - máter; gr – gliose reacional; gr/im – gliose reacional e infiltrado mononuclear; Mi – microglia; im – infiltrado mononuclear; il – infiltrado linfocitário; v- vaso sanguíneo; PC – plexo coróide. Os cortes foram corados com H.E. e visualizados em microscopia óptica. Barras = 100µm (A, B, C, E, F, G, H, I); 50µm (D).



**Figura 4.19: Quantificação das alterações no tecido cerebral dos camundongos infectados com DENV2 e dos vacinados com o pcTPANS1 e desafiados.** Foram atribuídos graus utilizando uma escala subjetiva de 0 a 4 para as diferentes alterações. Alterações circulatórias e infiltrados: 0 = ausência, 1 = leve e focal, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = difuso. (n = 3 a 5). Barras = mediana das alterações.



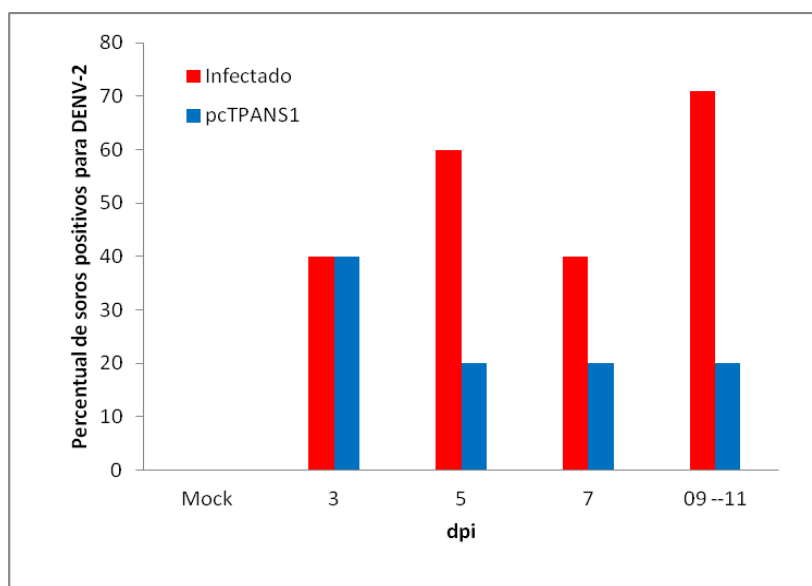
**Figura 4.20: Aspectos histopatológicos do tecido cerebelar em camundongos BALB/c imunizados com o pcTPANS1 e desafiados com DENV2.** Animais vacinados e desafiados no 1<sup>o</sup> d.p.i., exibindo o tecido íntegro, sem espessamento da pia-máter (A) e com hiperplasia de células da microglia na substância branca (B). Camundongos no 10<sup>o</sup> d.p.i. apresentando a pia - máter focalmente espessada (C), infiltrados mononucleares discretos ao redor dos vasos (D), apesar do tecido se mostrar preservado (E). pm- pia - máter; Mi – microglia; v- vaso sanguíneo; ipv – infiltrado perivascular. Os cortes foram corados com H.E. e visualizados em microscopia óptica. Barras= 200 µm (C); 100µm (A, E); 50µm (B, D).

#### **4.2.3. Detecção de DENV2 no sangue dos animais imunizados com pcTPANS1 e desafiados com o vírus**

A presença do vírus no soro dos camundongos imunizados com pcTPANS1 e desafiados com o DENV2 também foi avaliada em ensaios de detecção de plaques em células Vero (Tabela 4.2 e Figura 4.21). Alguns animais foram positivos para a existência do vírus, porém o percentual destes se mostrou bem menor do que o detectado nos animais somente infectados com o DENV2 (Figura 4.21).

	<b>3 d.p.i.</b>	<b>5 d.p.i.</b>	<b>7 d.p.i.</b>	<b>11 d.p.i.</b>
<b>NÚMERO DE ANIMAIS</b>	<b>++</b> 2(5)	<b>+</b> 1(5)	<b>+</b> 1(5)	<b>+</b> 1(5)

**Tabela 4.2: Número de camundongos BALB/c positivos para presença de partículas de DENV2 no soro.** Os soros dos animais foram coletados nos diferentes dias após a infecção e avaliados em ensaio de detecção de plaque em monocamadas de células Vero. O número de animais positivos, fora do parêntese, também está representado por (+). Número total de animais está representado entre parênteses. (n=5).



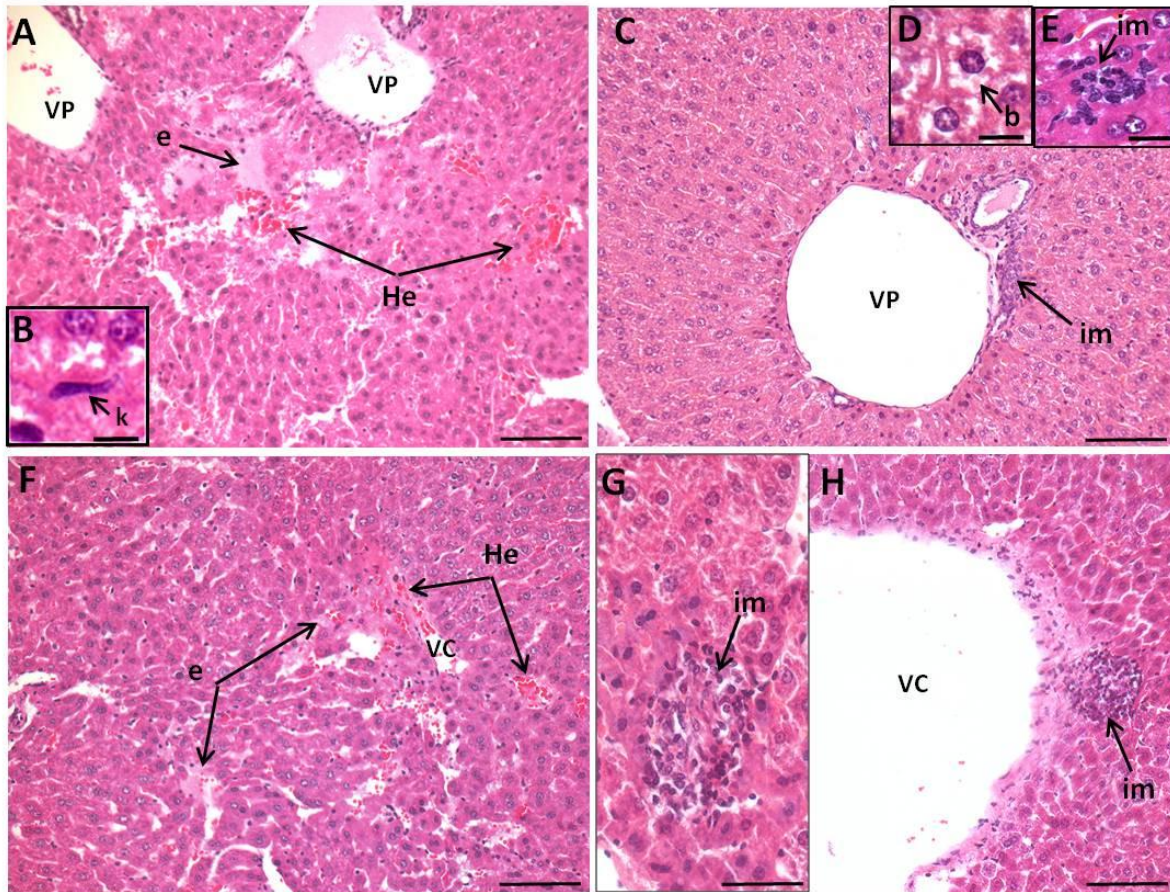
**Figura 4.21: Proporção de animais positivos para a detecção de DENV2, vacinados ou não com o pcTPANS1.** A detecção de partículas virais infecciosas foi realizada pela análise da formação de plaques em células Vero.

#### **4.2.4. Análises histológicas do fígado dos camundongos imunizados com pcTPANS1**

Estudamos também o tecido hepático dos camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1 em diferentes dias após o desafio com o DENV2. Assim como observado nos animais somente infectados com DENV2, os camundongos vacinados também

apresentaram números elevados de células de Kupffer logo no início após a inoculação com vírus até o final do estudo (Figura 4.20 C).

No 1<sup>o</sup> d.p.i. os animais exibiram extensas regiões de edema e hemorragia (Figura 4.22 B, 4.24 A e B), algumas áreas do parênquima contendo hepatócitos baloniformes (Figura 4.22 E) e infiltrados mononucleares perivasculares ou distribuídos pelo parênquima (Figura 4.22 D e F), de modo semelhante ao observado nos animais não vacinados e infectados. Por outro lado, no 3<sup>o</sup> d.p.i. o fígado dos animais imunizados apresentou uma melhora em relação ao parênquima, com bem pouca visualização de hepatócitos baloniformes. Neste ponto da cinética os animais continuaram a exibir infiltrados mononucleares (Figura 4.22 H e I) e células de Kupffer hiperplásicas. Danos circulatórios também foram detectados, porém em menores proporções quando comparado ao 1<sup>o</sup> d.p.i. (Figura 4.22 G).

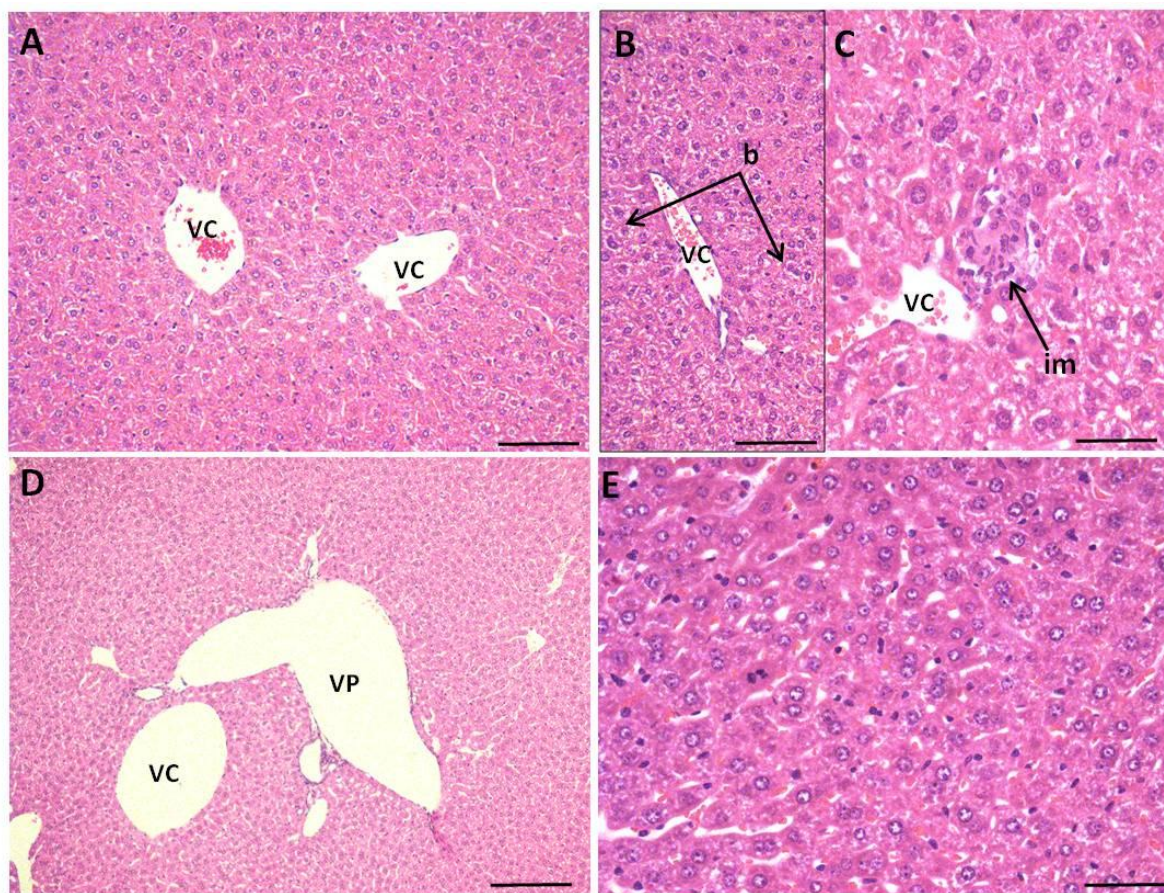


**Figura 4.22: Aspectos histopatológicos do tecido hepático de camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2.** Animais observados no 1<sup>o</sup> d.p.i., exibindo áreas de edema e hemorragia (A), células de Kupffer hipertrofiadas (B), infiltrado mononuclear periportal (C) e distribuído pelo parênquima (E), e focos de balonização hepatocitária (D). Animais vacinados e desafiados, no 3<sup>o</sup> d.p.i., com edema e hemorragia (F), infiltrados mononucleares no parênquima (G) e ao redor dos vasos (H). VP - veia porta; VC – veia centrolobular; b - balonização hepatocitária; e - edema; He –hemorragia; im – infiltrado mononuclear; k – célula de Kupffer. Barras= 100µm (A, C, F, H); 50µm (G); 20 µm (B, D, E).

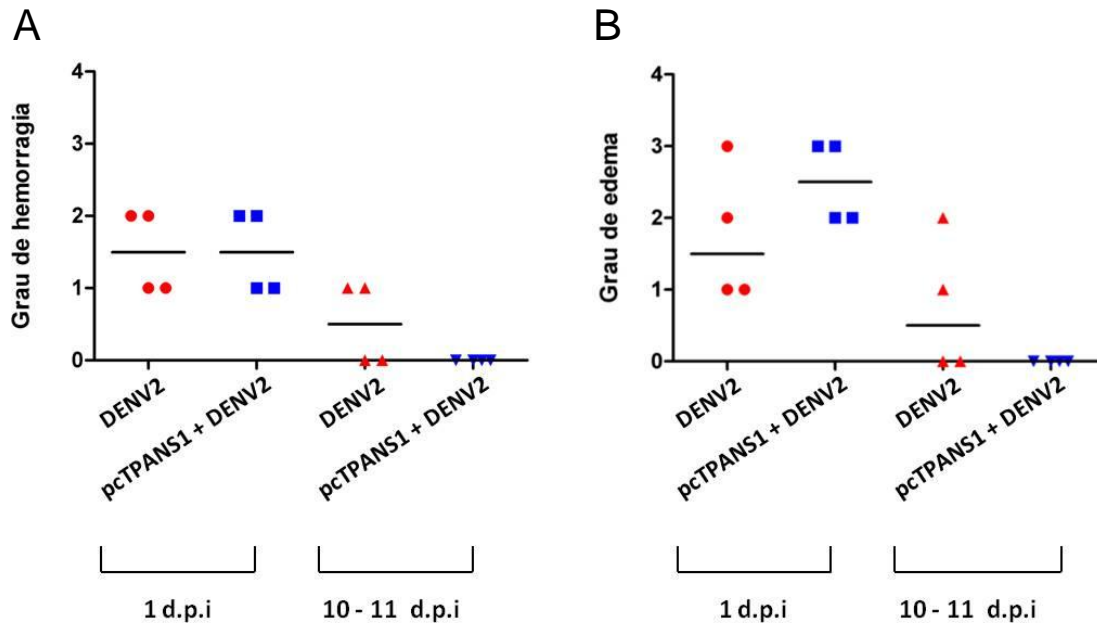
Entre os dias 5 e 7 após o desafio, o tecido hepático dos animais se mostrou bastante semelhante. A observação de hepatócitos baloniformes se restringiu a áreas ao redor do espaço porta (Figura 4.23 B), enquanto que hepatócitos ao redor das veias centrolobulares se mostraram íntegros (Figura 4.23 A). Por outro lado, os infiltrados mononucleares apareceram tanto no parênquima quanto ao redor dos vasos (Figura 4.23 C). No último dia da cinética, 11<sup>o</sup> d.p.i., o tecido hepático dos camundongos não mostrou alterações circulatórias (4.24 A e B) e o tecido estava recuperado, com os vasos (Figura 4.23 D) e o

parênquima (Figura 4.23 E) preservados. Entretanto, notamos no tecido um aumento da celularidade nos sinusóides hepáticos (Figura 4.23 E).

De um modo geral, os estudos no tecido hepático dos animais vacinados com o pcTPANS1 e desafiados com DENV2 revelaram que, em um primeiro momento, os animais apresentaram danos semelhantes aos não vacinados, e posteriormente tais danos se tornaram mais discretos, sendo que ao final da cinética o parênquima e vasos se mostraram recuperados. Por outro lado, nos animais vacinados observamos uma maior incidência de infiltrados mononucleares quando comparado aos camundongos somente infectados.



**Figura 4.23: Aspectos histopatológicos do tecido hepático em camundongos BALB/c imunizados com pcTPANS1 e desafiados com DENV2.** Animal no 5<sup>o</sup> d.p.i. exibindo o parênquima preservado ao redor das veias centrolobulares (A), balonização hepatocitária periportal (B) e infiltrado mononuclear ao redor dos vasos (C); Animais no 11<sup>o</sup> d.p.i. com o parênquima e vasos preservados (D e E). VP - veia porta; VC – veia centrolobular; B – balonização hepatocitária; I – infiltrado mononuclear. Barras= 100μm (A, B, D, E); 50 μm (C).

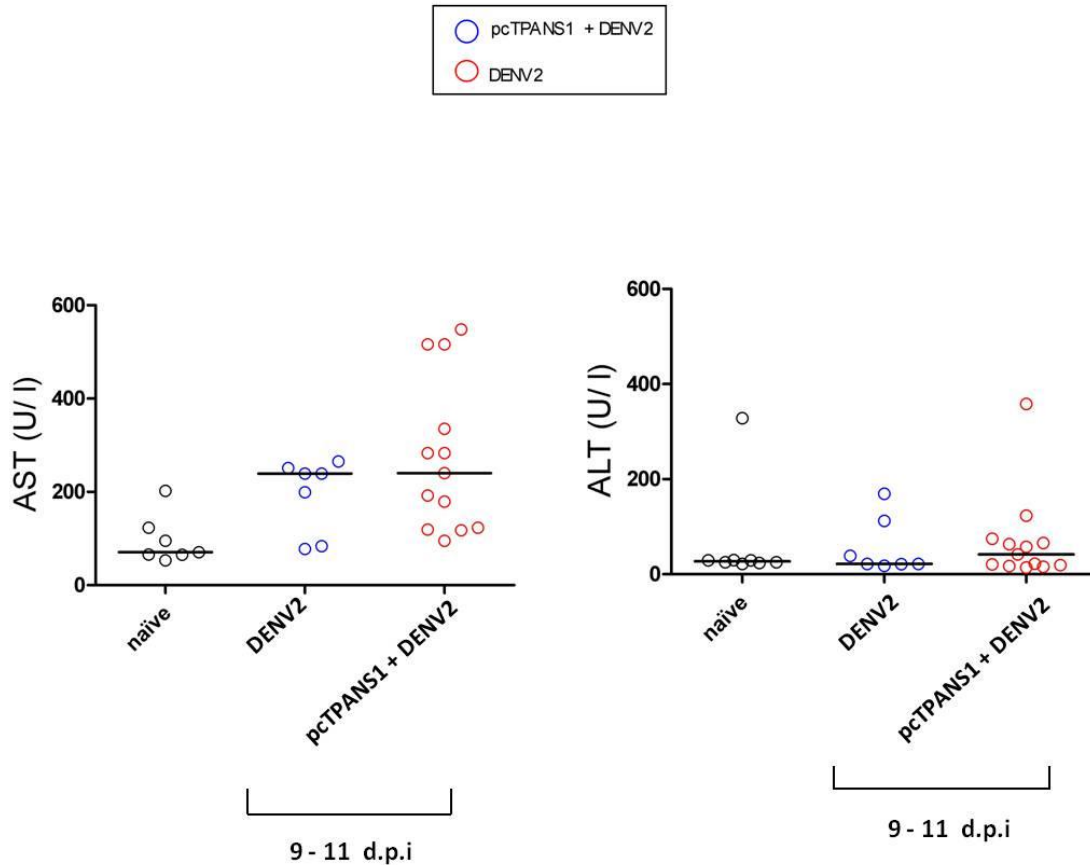


**Figura 4.24: Quantificação das alterações no hepático dos camundongos infectados com DENV2 vacinados ou não com o pcTPANS1.** Foram atribuídos graus utilizando uma escala subjetiva de 0 a 4 para as diferentes alterações. Alterações circulatórias: 0 = ausência, 1 = leve e focal, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = difuso. Barras = mediana. (n = 4).

#### 4.2.5. Detecção dos níveis séricos das enzimas hepáticas ALT e AST nos animais imunizados com pcTPANS1

Os níveis das enzimas ALT e AST no soro dos animais vacinados com o pcTPANS1 e desafiados com DENV2 foram analisados (Figura 4.25 A e B). Nos pontos finais da cinética (do 9<sup>o</sup> ao 11<sup>o</sup> d.p.i.), os camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com DENV2 não apresentaram diferença significativa nos níveis de AST e ALT em relação ao que foi observado no soro dos animais somente infectados com o vírus (figura 4.25 A).



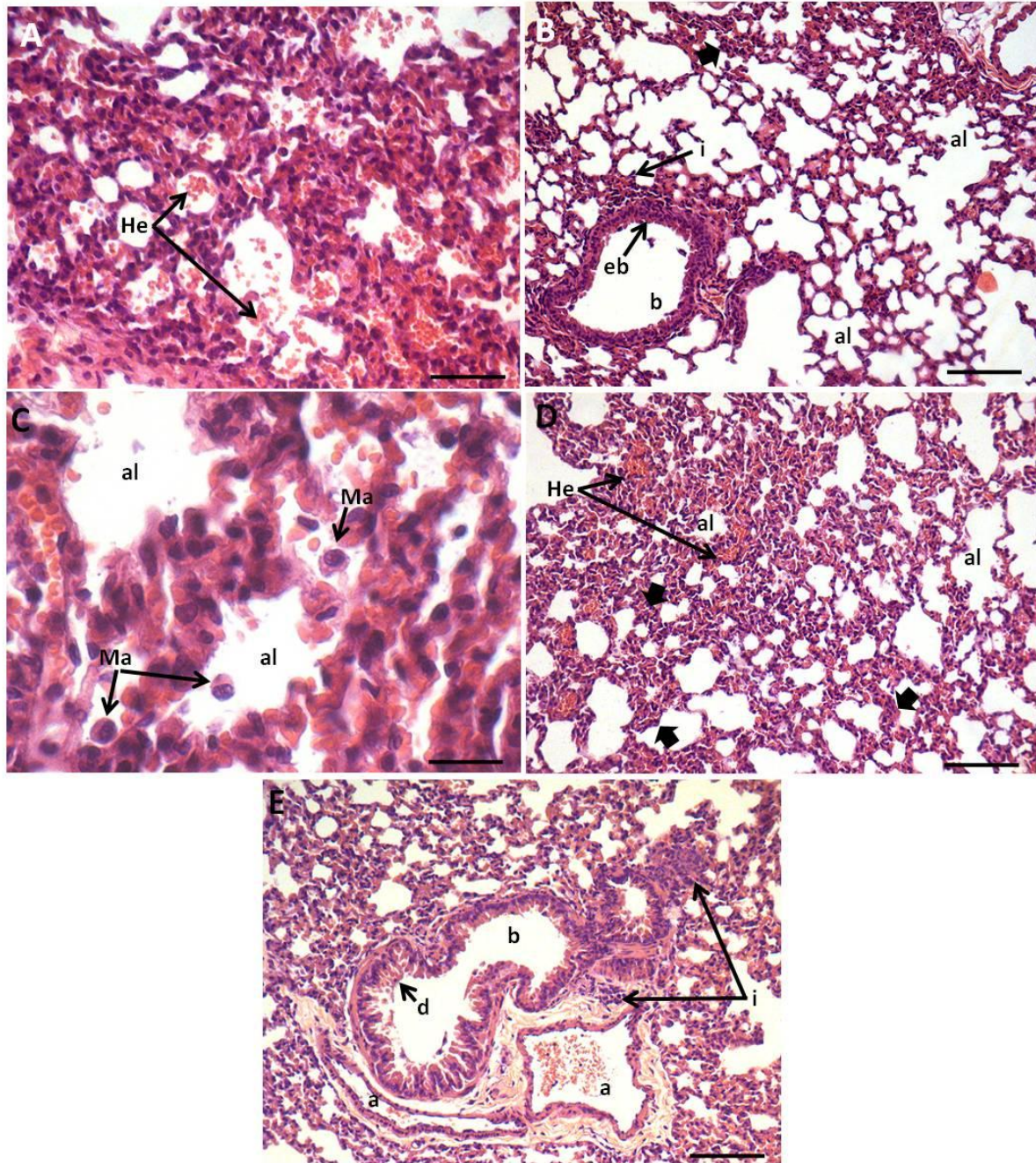


**Figura 4.25:** Níveis séricos das enzimas AST (A) e ALT (B) dos animais infectados com DENV2 vacinados ou não com o pcTPANS1 e camundongos naïves. (n= 6 a 13). Barras = medianas.

#### 4.2.6. Análises histológicas do pulmão dos camundongos imunizados com pcTPANS1

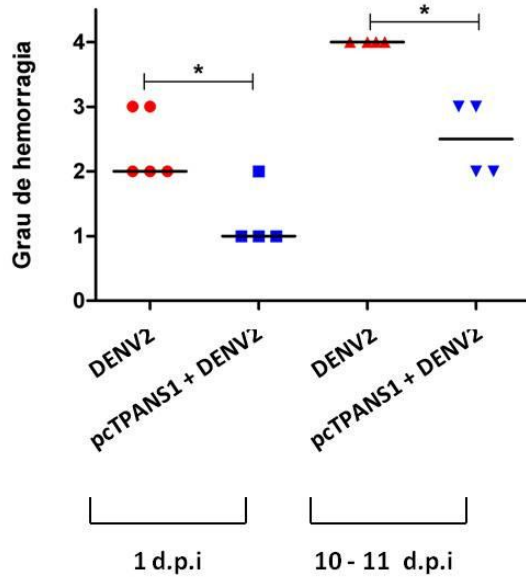
O tecido pulmonar também foi um dos alvos de estudo em camundongos imunizados com a vacina pcTPANS1. Traçando um paralelo com os camundongos somente infectados, os animais imunizados e desafiados, analisados do 1<sup>o</sup> d.p.i., apresentaram lesões hemorrágicas mais discretas (Figura 4.26 A e 4.27 A) e os septos interalveolares mostraram um grau mais leve de espessamento (Figura 4.26 B e 4.27 B). O epitélio bronquiolar não sofreu descamações significativas, permanecendo com uma estrutura normal (Figura 4.26 B), e ao redor dos bronquíolos foram encontrados apenas infiltrados leves (Figura 4.26 B). Nesse início de cinética, os camundongos vacinados e desafiados exibiram um maior número de macrófagos alveolares quando comparado aos animais somente infectados

(Figura 4.26 C). No 11<sup>o</sup> d.p.i., a hemorragia e o espessamento dos septos interalveolares nos animais imunizados também sofreu uma redução estatisticamente significativa, quando comparada ao detectado nos animais somente infectados (Figura 4.26 D, 4.27 A e 4.27 B). Por outro lado, o epitélio bronquiolar parece ter sofrido uma descamação maior nesse tempo da cinética em relação ao início, apesar de em menor extensão quando comparado aos nos camundongos somente infectados (Figura 4.26 E). Também no 11<sup>o</sup> d.p.i., o tecido pulmonar dos animais imunizados e desafiados revelou um maior número de infiltrados ao redor dos bronquíolos do que o observado no começo da cinética (Figura 4.26 E), porém, ainda assim, em quantidades menores do que os encontrados nos camundongos somente infectados com DENV2. Portanto, de um modo geral, o tecido pulmonar dos animais imunizados com o pcTPANS1 e desafiados se mostrou mais preservado frente às lesões encontradas no tecido dos animais não vacinados e infectados com o DENV2.

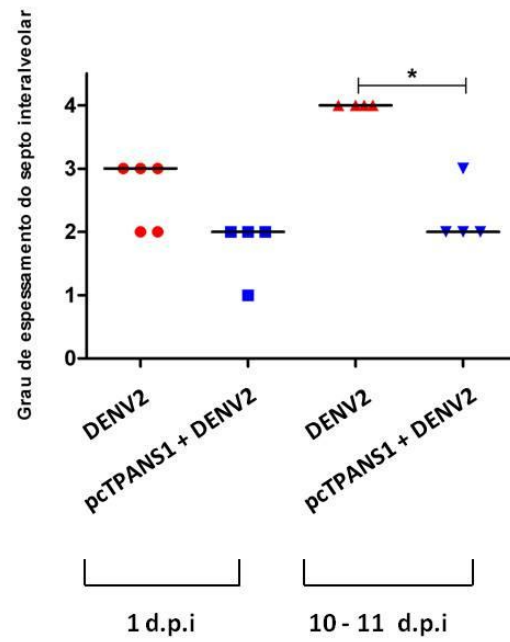


**Figura 4.26: Aspectos histopatológicos do tecido pulmonar em camundongos BALB/c imunizados e infectados com DENV2.** No 1<sup>o</sup> d.p.i., exibindo áreas discretas de hemorragia nos alvéolos (A) e espessamento dos septos interalveolares (B). Epitélio bronquiolar sem descamações graves (B) e número elevado de macrófagos alveolares (C). Animais no 10<sup>o</sup> d.p.i., apresentando de hemorragia (D), descamação do epitélio bronquiolar e o aumento do infiltrado peribronquiolar (E). b – bronquíolo; eb- epitélio bronquiolar; a – arteríola; al – alvéolo; He – hemorragia; Ma – macrófago alveolar; d – descamação do epitélio bronquiolar; im – infiltrado mononuclear; seta preta larga – espessamento do septo interalveolar. Barras = 100 µm (B, D); 50 µm (A, E); 20 µm (C).

A



B



**Figura 4.27: Quantificação das alterações no tecido pulmonar dos camundongos vacinados e infectados com DENV2.** Foram atribuídos graus utilizando uma escala subjetiva de 0 a 4 para as diferentes alterações. Hemorragia e espessamento dos septos interalveolares: 0 = ausência, 1 = leve e focal, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = difuso. (n = 4 ou 5). Barras = mediana das alterações. Teste estatístico de Mann-Whitney (\*p < 0,04).

## 5. DISCUSSÃO

Nos estudos que envolvem os casos humanos de dengue, cada vez mais vem se observando o comprometimento de diversos órgãos durante o curso da doença, principalmente nos casos fatais (Bhamarapravati *et al*, 1967, Nogueira *et al*, 2002; Ling *et al*, 2007; Sudaram *et al*, 2010; Gupta *et al*, 2013; Miranda *et al*, 2013, Póvoa *et al.*, 2014). Por outro lado, até o momento, os parâmetros frequentemente utilizados para avaliar a proteção gerada com vacinas contra a dengue em modelos murinos imunocompetentes como, por exemplo por inoculação de vírus por via i.c., são os de sobrevivência e morbidade dos animais (Porter *et al.*, 1998; Valdes *et al.*, 2009; Clements *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2011; Costa *et al.*; 2011). Poucos estudos avaliaram o efeito da infecção e/ou proteção gerada por vacinas em diversos órgãos destes animais. Sendo assim, neste trabalho investigamos os efeitos da infecção em diferentes órgãos e tecidos, como cérebro, cerebelo, fígado, pulmão e sangue, em um modelo murino amplamente utilizado em testes de vacinas contra dengue. Tais avaliações nos tecidos também foram realizadas com o objetivo de se estudar a proteção gerada pela vacina de DNA pcTPANS1 construída pelo nosso grupo.

Uma questão muito levantada é a artificialidade do modelo de inoculação do vírus pela via i.c., por não ser a sua via de infecção natural e, portanto, não reproduzir os sintomas típicos que são observados em humanos (Amorim *et al*, 2014). Contudo, esse é um dos poucos modelos no qual os animais imunocompetente são capazes de manifestar sinais aparentes da infecção (Guabiraba & Ryffel, 2013). Os sinais de morbidade geralmente surgem a partir do 7<sup>o</sup> d.p.i., quando se observa o comprometimento da coluna vertebral (curvada) e a paralisia de membros inferiores e superiores. No nosso modelo de estudo, utilizando camundongos imunocompetentes BALB/c inoculados com DENV2 NGC por via i.c. observamos que após a infecção viral a morbidade dos animais imunizados com o pcTPANS1 foi muito inferior quando comparada a dos animais não vacinados. Isso se reflete na sobrevivência dos animais, cujo percentual é significativamente superior nos camundongos imunizados em comparação com aqueles que foram somente infectados. Com base nessas análises, podemos constatar que a vacina pcTPANS1, que é administrada

por via i.m., exerce um papel protetor aos animais submetidos ao desafio viral, reduzindo a morbidade relacionada aos sinais neurológicos e o óbito.

No presente trabalho, avaliamos o efeito da infecção e da imunização por outros parâmetros, analisando os aspectos histopatológicos dos tecidos cerebral e cerebelar, hepático e pulmonar nos camundongos infectados. Observamos alterações circulatórias e de parênquima, além da migração de células inflamatórias ao longo da cinética de infecção. Essas alterações tanto no cérebro/cerebelo como no fígado e no pulmão dos camundongos infectados por DENV2, são semelhantes ao que tem sido relatado nos casos fatais de dengue e que cada vez mais vem sendo alvo de estudos em humanos (Burke, 1968; Bhamarapravati *et al*, 1967, 1989; Rosen *et al* 1989; Couveland *et al*, 1999; Basílio-de-Oliveira *et al*, 2005; Carod-Artal *et al*, 2013; Gupta *et al* 2013; Puccioni-Sohler *et al*, 2012; Póvoa *et al*, 2014).

A infecção do sistema nervoso central pelo DENV no modelo murino com inoculação pela via i.c. ocasiona alguns sinais clínicos como paralisia dos membros inferiores (Costa *et al*, 2006). Em casos humanos da doença, os relatos de indivíduos manifestando sinais e sintomas neurológicos, que variam desde uma disfunção muscular a encefalites e síndromes, vêm aumentando com o passar dos anos (Leão *et al*, 2002; Carod-Artal *et al*, 2013; Malhotra & Garg, 2014; Solbrig & Perng, 2015). Além disso, estudos em modelo murino indicam um neurotropismo do DENV e a quebra de barreira hematoencefálica, nos quais o vírus inoculado por uma via periférica ocasionou paralisia nos animais e foi detectado muitas vezes no cérebro (Chaturvedi *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2004; Velandia-Romero *et al*, 2012; Guabiraba & Ryffel, 2013).

Em nossas análises do tecido cerebral/cerebelar observamos que, assim como relatado em alguns estudos com modelo murino imunocompetente (Falgout *et al*, 1990; Amaral *et al*, 2011; Amorim *et al*, 2012), a inoculação intracerebral de DENV em camundongos BALB/c causou uma encefalite. Foi observado o espessamento da pia-máter com a presença de inflamação, além de lesões circulatórias em todos os pontos da cinética (de 1 d.p.i. à 10 d.p.i.). Nos pontos finais da infecção, os animais apresentaram uma exacerbação da resposta inflamatória, com presença de infiltrados difusos no córtex e perivasculares e gliose reacional, correlacionado com os sinais clínicos neurológicos presentes nos camundongos infectados, o que sugere o rompimento da barreira hemato-

encefálica. Nesse mesmo período, o tecido cerebelar também se mostrou inflamado, com o espessamento da pia-máter e infiltrados perivasculares, apesar desta inflamação ser mais discreta. Porém, no começo da infecção a hiperplasia de microglia se destacou na substância branca, diferente do observado no tecido cerebral, onde tais efeitos foram detectados mais nos pontos finais da cinética.

Nas análises histopatológicas do cérebro e cerebelo, vimos que grande parte do infiltrado inflamatório observado no final da cinética da infecção era constituído por células linfocitárias. Em outro trabalho do nosso grupo, esses infiltrados foram caracterizados por citometria de fluxo, revelando a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nesse mesmo período, o que sugere uma possível correlação entre a presença desses infiltrados linfocitários e as lesões hemorrágicas também detectadas no final da cinética (apêndice 1). Além disso, podemos afirmar que a inflamação observada no cérebro não se deve a técnica de inoculação intracerebral, uma vez que nos animais inoculados com o *mock* não foram observados tais efeitos.

A reação inflamatória no cérebro/cerebelo no final da cinética pode ser consequência da resposta de células residentes do tecido cerebral e cerebelar, como microglia ativada, e também da drenagem de antígenos para os linfonodos cervicais que sensibilizariam os linfócitos T. No passado, acreditava-se que o cérebro fosse um órgão imunoprivilegiado, estando isolado da ação do sistema imunológico do organismo. Entretanto, recentemente foi descoberto que os antígenos virais podem ser drenados junto ao fluido intersticial do cérebro por um sistema linfático particular que os levaria para os linfonodos cervicais, onde por sua vez ativariam os linfócitos T que infiltram o SNC pelo sangue causando uma resposta inflamatória (Laman & Weller, 2013; Aspelund *et al*, 2015). A migração de leucócitos para o cérebro/cerebelo dos camundongos infectados também seria facilitada pelo aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, estimuladas por citocinas anti-virais (Weller et al., 1996; Amaral *et al*, 2011). Além disso, a resposta pró-inflamatória de microglia, astrócitos e de leucócitos recrutados para o tecido cerebral, assim como a própria infecção das células endoteliais, provavelmente geram um mau funcionamento do endotélio que compõe a barreira hematoencefálica, resultando em danos circulatórios, como áreas que sugerem edema e hemorragia (Avirutnan *et al.*, 1998; Ashhurst *et al*, 2013, Jensen *et al*, 2013; Barkhordarian *et al*, 2015).

A vacina pcTPANS1 parece ter minimizado os efeitos da replicação viral no tecido cerebral, uma vez que as alterações histopatológicas foram ausentes no começo da cinética, e no final desta (11<sup>o</sup> d.p.i.) os animais imunizados apresentaram alterações circulatórias bem reduzidas, quando comparadas as dos animais infectados. Contudo, apesar de também ter ocorrido a diminuição dos infiltrados perivasculares e da pia-máter nos animais vacinados, no 11<sup>o</sup> d.p.i. o número de microglia, infiltrados mononucleares e os focos de gliose reacional no córtex se mostrou mais elevado. Já no tecido cerebelar dos animais vacinados, no 11<sup>o</sup> d.p.i., ocorreu um aumento do número de células inflamatórias na pia-máter, assim como de infiltrados perivasculares e hiperplasia de microglia na região da substância branca, em comparação aos animais somente infectados. Os animais imunizados com a vacina pcTPANS1 não apresentaram nenhum sinal clínico após o desafio viral durante toda a cinética. Ao que parece, no tecido nervoso pode ter ocorrido uma forte resposta celular, aparentemente protetora, já que houve a redução das lesões no tecido desde o 1<sup>o</sup> d.p.i. Isso pode ter sido consequência de uma prévia sensibilização dos linfócitos T nos linfonodos cervicais (Laman & Weller, 2013) pelo antígeno NS1 gerado pela vacina. Sendo assim, após a infecção i.c, o antígeno NS1 do DENV2 drenado do cérebro para os linfonodos cervicais ativaria diretamente esses linfócitos gerando uma resposta com um perfil anti-inflamatório direcionada para o cérebro dos animais vacinados. Contudo, para a confirmação dessa hipótese, futuramente deve ser realizada a caracterização do tipo de resposta desses infiltrados. Um estudo anterior do nosso grupo revelou que a vacina pcTPANS1 induz uma resposta de células T CD4<sup>+</sup> e que esta resposta, junto à presença de anticorpos anti-NS1 também gerados com tal imunização, tem um papel importante na proteção contra a infecção dos camundongos por via i.c. (apêndice 2).

O cérebro apresentou áreas focais de gliose reacional (aglomerado de células da glia) no córtex cerebral, tanto nos camundongos somente infectados quanto nos vacinados e desafiados, sendo estas mais frequentes nos animais imunizados. Esse processo de proliferação de células da glia relacionado à inflamação do tecido cerebral vem sendo alvo de estudos nos últimos anos. Tem sido crescente a evidência do papel dos astrócitos na resposta imune no tecido cerebral (Jensen *et al*, 2013). Estas células seriam hábeis em liberar citocinas pró ou anti-inflamatórias e quimiocinas que, junto às microglia, influenciariam o tipo de resposta das células T efetoras e modulariam o funcionamento da



barreira hematoencefálica (Jensen *et al*, 2013). Adicionalmente, os astrócitos podem atuar também como células apresentadoras de antígeno, que induz a proliferação de células T no cérebro (Jensen *et al*, 2013). Recentemente, foi sugerido que no processo da gliose reacional ocorre a conversão de astrócitos maduros em progenitores neurais, com capacidade de se proliferar e diferenciar em neurônios e/ou em novos astrócitos (Gabel *et al*, 2015). Portanto, a gliose reacional encontrada nos animais infectados, vacinados ou não, pode ter sido um fator que levou a atração de leucócitos para o cérebro. No caso do tecido cerebral dos animais somente infectados, os astrócitos que compõem os focos de gliose reacional poderiam ter um perfil de resposta pró-inflamatória, modulando o infiltrado composto também de células T para uma resposta imune efetora inflamatória. Já no caso dos animais imunizados, o perfil de citocinas liberadas pelos astrócitos poderiam modular as células T para uma resposta anti-inflamatória. Tal hipótese deverá ser testada no futuro, com avaliação do perfil de citocinas presentes no tecido nervoso destes animais. Além disso, essas células da glia podem ter se proliferado no processo para gerar novos neurônios e astrócitos a fim de restaurar o tecido cerebral.

Como já se sabe, o fígado é um dos órgãos alvo da doença e seu envolvimento é bem documentado durante a infecção por DENV em humanos, com evidência de hepatomegalia, hemorragias e detecção do vírus e de seus antígenos no tecido hepático (Bhamarapavati *et al*, 1967; Burke, 1968; Seneviratne *et al*, 2006; Smith *et al*, 2009; Póvoa *et al.*, 2014). Além dos casos fatais, existem também estudos em modelos murinos com inoculação viral por vias periféricas apontando o envolvimento do tecido hepático, com alterações histopatológicas, viremia, detecção e replicação do DENV. (Chen *et al.*, 2004; Paes *et al*, 2005, 2009; França *et al*, 2010; Sung *et al.*, 2012). Nosso estudo do tecido hepático dos camundongos durante a infecção mostrou que as lesões circulatórias, como hemorragia e edema, e a presença de infiltrados mononucleares foram mais difusas logo no começo da cinética. No decorrer da infecção, tais alterações histopatológicas se tornaram mais discretas e os danos de parênquima (balonização hepatocitária periportal e microesteatose) começaram a surgir a partir do 5<sup>o</sup> d.p.i.. Contudo, no final da cinética foi observada uma regeneração do parênquima hepático, com ausência dessas alterações. Apesar dos danos de parênquima serem relatados em alguns casos na região intermediária entre a região centrolobular e periportal, tanto em dengue quanto na febre amarela (Huerre

*et al.*, 2001; Quaresma *et al.*, 2006) , a localização preferencial de danos no parênquima foi ao redor do espaço porta, que também é vista em pacientes com dengue (Burke, 1968; Póvoa *et al.*, 2014), atingindo os hepatócitos que beiram a via de entrada do sangue no fígado, podendo ser a região com a qual o vírus primeiramente entra em contato. De acordo com alguns estudos mais recentes, a formação de gotas lipídicas no citoplasma celular, como a microesteatose observada nos camundongos infectados, pode ser um fator que favorece a replicação do DENV, em que proteínas virais como a NS3 induziriam o aumento da síntese de ácido graxo no hepatócito (Heaton *et al.*, 2010; Heaton & Randall, 2010). Apesar de ter ocorrido uma diminuição dos danos circulatórios nos pontos finais da infecção, foram encontradas células endoteliais tumefeitas revestindo os vasos, sugerindo que houve uma alteração endotelial no tecido. Esses achados histopatológicos no fígado dos camundongos infectados muito se assemelham aos encontrados nos casos fatais de dengue (Bhamarapravati *et al.*, 1967; Burke, 1968; Póvoa *et al.*, 2014).

Há um debate acerca da causa dos danos observados no fígado durante a doença, que podem ser resultantes do efeito direto do vírus ou da resposta imune desregulada do hospedeiro. Ou seja, existiriam sorotipos e genótipos de dengue com tropismo para o tecido hepático e/ou linfócitos T ativados que teriam um efeito citotóxico às células hepáticas e produziram citocinas pró-inflamatórias, causando danos ao tecido (Gagnon *et al.*, 1999; Seneviratne *et al.*, 2006; Mathew & Rothman, 2008; Smith & Khakpoor, 2009; Trung *et al.*, 2010; Guabiraba & Ryffel, 2013). Índícios na literatura apontam que o aumento de infiltrados mononucleares ativados no tecido hepático está correlacionado com a patologia do fígado durante a infecção e ao aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas (Sung *et al.*, 2012). De acordo com alguns estudos, esses infiltrados seriam principalmente constituídos por células NK na fase inicial da infecção, enquanto que os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e, majoritariamente, TCD8<sup>+</sup> formariam esses infiltrados em uma fase mais tardia (Chen *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2012). Nesses estudos com camundongos imunocompetentes, o pico do aumento na proporção de linfócitos T, principalmente de TCD8<sup>+</sup>, no sangue e no tecido hepático ocorre no 5<sup>o</sup> d.p.i. (Chen *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2012). De modo semelhante, um estudo do nosso grupo também com inoculação de DENV2 por via i.c. mostrou que no 5<sup>o</sup> d.p.i. a percentagem de linfócitos T ativados no sangue estava aumentada, principalmente de TCD8<sup>+</sup> (apêndice 1). Entretanto, no fígado a percentagem das subpopulações de TCD4<sup>+</sup>

e TCD8<sup>+</sup> ativadas se mostrou mais elevada ao final da infecção, juntamente com os níveis de AST, confirmando uma possível relação de causa e efeito das lesões hepáticas. Além disso, no presente trabalho, nas análises histopatológicas desse período os infiltrados mononucleares se mostraram mais presentes. Tais dados favorecem a hipótese de uma correlação entre a presença de infiltrados linfocitários e as lesões hepáticas decorrentes da infecção por DENV2. Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem também que a presença de infiltrado inflamatório no fígado estaria relacionada à morte celular hepática (Chen *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2012). Portanto, futuramente, desejamos investigar essa relação entre infiltrado e morte celular.

Em pacientes com dengue é usualmente documentado um aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas (Kuo *et al.*, 1992; de Souza *et al.*, 2000, 2007; Ling *et al.*, 2007). Adicionalmente, nos casos fatais, as biópsias de fígado evidenciam infiltrados de células inflamatórias em pacientes que apresentam níveis altos de transaminases (de Macedo *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2012, Kularatne *et al.*, 2014). Portanto, acredita-se que a resposta inflamatória observada no fígado gera danos ao tecido, que por sua vez se reflete no aumento dos níveis de AST e ALT (Kuo *et al.*, 1992; Huerre *et al.*, 2001, Seneviratne *et al.*, 2006; Martina *et al.*, 2009; Sung *et al.*, 2012; Pagliari *et al.*, 2014; Samanta & Sharma, 2015). Nos nossos estudos, observamos uma mudança nos níveis AST ao final da infecção com DENV2, o que pode representar um efeito cumulativo dos danos detectados no tecido hepático destes animais desde o início. Embora os níveis séricos de ALT tenha se mostrado elevados em alguns animais após a infecção com DENV2, tal aumento não foi observado na maioria dos camundongos. Entretanto, o aumento dos níveis de AST se mostrou significativo em relação aos animais controle, podendo sugerir uma injúria não só do parênquima hepático, como também de outros tecidos como o muscular. Já se sabe que em infecções por dengue o aumento da concentração sérica de AST costuma ser superior ao de ALT, o que difere do padrão encontrado em outras hepatites virais (Gholson *et al.*, 1990). O significado dessa diferença não é claro, embora alguns estudos sugeriram que ela se deva ao fato da AST também ser liberada por miócitos que são lesionados durante a infecção (Chung *et al.*, 1992). A análise dessas enzimas nos animais vacinados e desafiados mostrou que, em média, não houve variação nos níveis séricos de ALT nem de AST, em comparação aos camundongos somente infectados. Tal fato foi surpreendente, uma vez que

os camundongos vacinados apresentaram uma recuperação mais rápida do parênquima hepático em relação aos animais somente infectados. Entretanto, os níveis detectados AST podem refletir um efeito cumulativo desta enzima, permanecendo alterado mesmo após a recuperação do tecido.

Nos camundongos imunizados com o pcTPANS1 e desafiados com DENV2, observamos que no 1<sup>o</sup> d.p.i. havia alterações similares às encontradas nos animais somente infectados. Provavelmente, a presença dessas alterações se deve ao fato da vacina pcTPANS1 não possuir um caráter esterilizante. Ou seja, para que a vacina possa exercer um papel na proteção, há a necessidade de que ocorra replicação viral, pelo menos em pequena escala, uma vez que esta vacina é baseada em uma proteína não estrutural do DENV2, a NS1. Portanto, a resposta imune contra NS1 só apresentará efeito após a expressão desta proteína no hospedeiro infectado. Entretanto, nos nossos estudos as alterações hepáticas começaram a regredir já a partir do 3<sup>o</sup> d.p.i., sendo que no último ponto da cinética (11<sup>o</sup> d.p.i.) a regeneração tecidual se mostrou mais intensa. Diante disso, podemos sugerir que 1 d.p.i. seria um tempo curto para que a vacina de DNA baseada na proteína NS1 pudesse exercer alguma função. Entretanto, no decorrer dos dias vimos que a vacina pcTPANS1 atuou na regeneração do tecido hepático dos animais após estes terem sido desafiados com o vírus. Esse resultado se correlaciona com outros estudos de protótipos vacinais que sugerem um papel protetor da proteína NS1 (Henchal et al, 1988; Falgout *et al*, 1990; Wu *et al*, 2003; Amorim *et al*, 2014).

Os estudos com casos fatais de dengue vêm mostrando que o pulmão tem um importante envolvimento durante a infecção por DENV, sendo um órgão bastante afetado por lesões circulatórias e com detecção de antígenos virais, o que pode ser a causa desses óbitos (Bhamarapravati, 1967, Burke *et al*, 1968, 1988; Miagostovich *et al*, 1997; Basílio-de-Oliveira *et al*, 2005; Póvoa *et al*, 2014). Entretanto poucos estudos em modelos animais investigam a participação do tecido pulmonar na patogênese da doença (Hotta *et al*, 1981; Barth *et al*, 2006; Barreto *et al*, 2004, 2007). Em nosso trabalho, o pulmão dos animais também apresentou efeitos devido à infecção por DENV2. As alterações histopatológicas como hemorragia, edema, descamação epitelial dos bronquíolos, aumento do número de macrófagos alveolares, hiperplasia e hipertrofia de pneumócitos tipo II e o espessamento de septo interalveolar se mostraram presentes durante toda a cinética da infecção, sem grandes

variações. Contudo, notamos que no 3<sup>o</sup> d.p.i. se iniciou uma resposta inflamatória com infiltrados peribronquiolares mais extensos, e que ao final da cinética as alterações no tecido pulmonar foram mais graves, com exceção do edema. O 11<sup>o</sup> d.p.i. se destacou pelos animais exibirem lesões hemorrágicas muito extensas e difusas no interior dos alvéolos e um espessamento exacerbado dos septos interalveolares, reduzindo relevantemente a área alveolar por todo o tecido. Esse espessamento parece ter ocorrido devido ao aumento do número de células leucocitárias/macrófago que infiltraram os septos interalveolares em resposta a infecção viral. Sendo assim, a presença de infiltrado inflamatório junto às lesões circulatórias sugere que o efeito dessa resposta celular pode ter causado alterações no endotélio dos vasos pulmonares, que resultaram em hemorragia e edema. Análises com casos humanos de óbitos por dengue demonstraram aspectos histopatológicos similares aos encontrados em nosso modelo (Bhamarapavati *et al.*, 1967; Burke, 1968; Póvoa *et al.*, 2014). Entretanto, nos casos fatais foi observada a formação de membrana hialina na superfície dos septos interalveolares, o que não foi detectado nos camundongos infectados. Também observamos hipertrofia e hiperplasia dos pneumócitos do tipo II, o que caracteriza a sua proliferação, provavelmente em uma tentativa de restaurar a integridade epitelial do alvéolo após a injúria do tecido pulmonar com a infecção por DENV, já que estas células são progenitoras dos pneumócitos do tipo I que revestem os alvéolos (Fehrenbach, 2001).

Embora, os animais vacinados com pcTPANS1 também tenham apresentado lesões pulmonares, elas se mostraram reduzidas em ambos os pontos analisados da cinética (1<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> d.p.i.) em comparação aos camundongos somente infectados. Adicionalmente, o aumento do número de macrófagos alveolares no tecido logo no 1<sup>o</sup> d.p.i. e de infiltrados peribronquiolares pode indicar que a vacina pcTPANS1 reduziu os efeitos da infecção no pulmão através de uma resposta imune que moderou as injúrias a este órgão.

Nos diferentes tecidos, um ponto de destaque de toda a cinética de infecção foi a exacerbção dos infiltrados de células mononucleares, principalmente nos animais vacinados. Em comparação com os animais somente infectados, a análise qualitativa nos tecidos desses camundongos imunizados e desafiados com DENV2 mostrou um maior número de células mononucleares nos sinusóides e no parênquima hepático, de forma aglomerada ao redor dos bronquíolos pulmonares ou distribuídas pelo parênquima e ao

redor dos vasos no cérebro/cerebelo. Para estudarmos com mais detalhes esses infiltrados mononucleares dos animais vacinados ou não, pretendemos no futuro caracterizar e quantificar as subpopulações de macrófagos e células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, através de imunofluorescência. Esses estudos são importantes, uma vez que tais células têm um papel importante na resposta imune inata e adaptativa, frente à infecção com vírus da dengue. Além disso, alguns trabalhos têm apontado que a resposta celular tem relevante participação na proteção e/ou patogênese da dengue (Gao *et al*, 2008; Henriques *et al*, 2013; Pagliari *et al.*, 2014).

Outro aspecto em comum a todos os tecidos estudados foi a presença de lesões circulatórias, que podem ter ocorrido devido à disfunção do endotélio provocada por citocinas inflamatórias ou pela ação direta do vírus, levando ao extravazamento de plasma (edema) e às hemorragias nos tecidos (Calvert *et al*, 2015; Chuhakan *et al*, 2015). Esses dados sugerem que, uma única inoculação com DENV2 NGC por via i.c em camundongos BALB/c pode resultar em alguns efeitos característicos de dengue grave em humanos.

Geralmente, estudos de detecção viral conduzidos em modelos de camundongos imunocompetentes inoculados por uma via periférica com cepas não neuroadaptadas, demonstram viremia transiente, nos quais o vírus é detectado em diversos tecidos, inclusive no cérebro, fígado e pulmão (Chen *et al.*, 2004; Paes *et al*, 2005, 2009; Barth *et al*, 2006; Sung *et al.*, 2012). Entretanto, pouco se sabe sobre a disseminação viral em um modelo murino imunocompetente com inoculação de DENV por via intracerebral. Nossos estudos para a detecção do DENV2 no cérebro/cerebelo dos camundongos somente infectados, revelaram a presença de títulos virais altos durante todos os tempos da cinética da infecção, avaliados através da quantificação de plaques em célula Vero. Tais resultados já eram esperados, devido à via de inoculação (i.c.) com uma amostra viral neuroadaptada. Sabe-se que o DENV é um vírus que possui tropismo neural natural e estudos em camundongos com amostras não adaptadas já revelaram danos cerebrais, com detecção viral em neurônios, astrócitos, microglia e células endoteliais (Amaral *et al*, 2011; Ashhurst *et al.*, 2013; Gupta, 2013). Para investigarmos melhor a presença do vírus no cérebro/cerebelo dos camundongos infectados, quantificamos o RNA de DENV2 nesses tecidos. Observamos que 1 dia após o inóculo já ocorre replicação, pois o número de cópias do RNA viral aumentou em relação ao controle de 2h. A partir desse tempo o número de cópias do RNA

viral aumentou até o 7<sup>o</sup> d.p.i., se mantendo semelhante no 9<sup>o</sup> -11<sup>o</sup> d.p.i.. Tais dados podem indicar uma diminuição de replicação no tecido cerebral/cerebelar ou uma maior disseminação do vírus para a circulação. Junto a isso, a replicação também foi confirmada com a detecção da proteína NS3 no tecido cerebral e cerebelar. Até então, não havia trabalhos com indicação de vírus presente em infiltrados leucocitários da pia-máter (Ashhurst *et al.*, 2013). No nosso estudo, o vírus foi detectado em células que revestem a pia-máter e no infiltrado contido nela, além de microglia, neurônios, células endoteliais e mononucleares no neurópilo, no começo e no final da infecção. Em vista desses resultados, podemos concluir que após a inoculação do vírus pela via i.c, o DENV2 infecta e replica no tecido cerebral/cerebelar, causando alterações histopatológicas relevantes no parênquima cerebral. Este processo ocorre em poucas horas após a inoculação e o título máximo do vírus é encontrado no fim da cinética, com detecção de um antígeno viral (NS3) que só está presente quando há a replicação do DENV2.

Uma das restrições ao modelo de inoculação por intracerebral de DENV é a não infecção dos órgãos e tecidos alvo como ocorre em humanos. Todavia, em nosso estudo, o DENV2 foi detectado no soro dos animais infectados, principalmente nos pontos finais da cinética, demonstrando que a infecção pode causar um efeito sistêmico. Dessa forma, o vírus passa a ter a capacidade de infectar e se replicar em outros órgãos, como o fígado e o pulmão. A detecção do vírus no soro dos camundongos imunocompetentes demonstrou que realmente ele de alguma forma escapa do cérebro/cerebelo e ganha a circulação. Na literatura existem informações que podem ser aplicadas para hipotetizar como o vírus se torna circulante. Uma das hipóteses seria a de que o DENV2 passaria ativamente para o sangue através da replicação em células endoteliais da barreira hematoencefálica (Avirutnan *et al.*, 1998; Puccioni-Sohler & Rosadas, 2015). Outra alternativa seria a de que o vírus conseguiria atravessar de forma passiva a barreira hematoencefálica por entre as junções celulares, ou por quebra da barreira devido a disfunção endotelial causada pela resposta de citocinas à infecção (Chaturvedi *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2007; Barkhordarian *et al.*, 2015; Puccioni-Sohler & Rosadas, 2015). Além disso, o vírus poderia subverter a resposta de monócitos/macrófagos ou células dendríticas ao infectá-los, e a migração dessas células disseminaria o vírus pelo organismo (Ashhurst *et al.*, 2013). Uma forma na qual essa migração poderia acontecer, seria através do sistema de drenagem linfática do líquido

cefalorraquidiano do cérebro, cujo processo carrearia tais células até os linfonodos cervical e lombar, onde o vírus poderia se replicar e migrar para outros tecidos (Aspelund *et al.*, 2015; Laman & Weller, 2013). Há também uma outra via de drenagem linfática no cérebro que drena o fluido intersticial por canais, com espessura de apenas 100–150 nm, nas paredes de capilares e artérias (Aspelund *et al.*, 2015; Laman & Weller, 2013). Nesse fluido, as partículas virais presentes no cérebro poderiam ser também drenadas para os linfonodos cervicais e, dessa forma, propagadas para o organismo.

Com relação aos animais imunizados com a vacina pcTPANS1 e desafiados com o DENV2, houve uma diminuição do número de camundongos com detecção do vírus no soro. Portanto, os camundongos vacinados ficaram mais protegidos quanto à disseminação do vírus para outros órgãos periféricos. Além disso, mais uma vez se comprova que a vacina pcTPANS1 não é esterilizante, já que não houve eliminação completa do vírus nos indivíduos imunizados.

Por não ter sido possível estabelecer o título viral no soro dos animais infectados em ensaios de plaque com células Vero, realizamos o RT-PCR em tempo real para tentar aumentar a sensibilidade de detecção do DENV2. De forma contrária ao esperado, a quantificação do RNA viral nas amostras de soro resultou em um ciclo limiar (Ct - do inglês, *threshold cycle*) muito acima do Ct limite para uma detecção do RNA que não fosse inespecífica. Portanto, os baixos títulos virais obtidos não foram considerados por não serem confiáveis. Especulamos que pela pouca quantidade do vírus circulante, a chance de detectarmos seu RNA com a sensibilidade permitida pela técnica é baixa. Portanto, em repetição futura desse experimento, devemos tentar possíveis alterações no protocolo, a fim de aumentar a sensibilidade da técnica.

Também não conseguimos detectar a presença de DENV2 no fígado dos camundongos infectados. Acreditamos que a ausência de plaques se deve a baixa quantidade de partículas virais no tecido hepático. Por outro lado, nos ensaios de imunohistoquímica detectamos a proteína NS3 em hepatócito, células endoteliais que revestem os grandes vasos e células de Kupffer dos camundongos infectados, no início e no fim da cinética. Portanto, a presença desta proteína confirma a infecção e replicação do vírus no tecido hepático dos camundongos somente infectados. Outros estudos também apontam o fígado como um órgão alvo da infecção e relatam a presença de antígenos e



RNA virais (Bhamarapravati *et al*, 1964; Couvelard *et al*, 1999; Basílio-de-Oliveira *et al*, 2005; Paes *et al*, 2005, 2009; Póvoa *et al*, 2014).

Apesar de não detectarmos a presença de DENV2 no fígado em ensaios de plaque, verificamos sua presença no tecido pulmonar. Entretanto, os ensaios realizados geraram poucos plaques, assim como aconteceu com o soro, que foram identificados no 1<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> d.p.i. Portanto, não foi possível estabelecer o título viral nos diferentes pontos da cinética, nem avaliar se o número de animais positivos para o vírus aumenta ou diminui no decorrer da infecção. A baixa detecção de plaques no pulmão nos leva a crer que o vírus também possui um baixo número de partículas nesse tecido. Os testes de detecção da NS3 no pulmão ainda precisam ser aprimorados.

Sendo assim, de um modo geral, os nossos estudos demonstraram que o modelo murino clássico de infecção de DENV2 neuroadaptado inoculado pela via i.c. não só gera o aparecimento de sinais clínicos, mas também mostra efeitos periféricos com lesões e infiltrados inflamatórios, além da detecção do vírus nos tecidos. Além disso, também mostramos que a vacina pcTPANS1 é protetora quanto a estes parâmetros, apesar de não possuir um perfil esterilizante. Tais estudos poderão igualmente contribuir para a análise de proteção conferida por outras vacinas contra a dengue.

## 6. CONCLUSÕES

- Os camundongos infectados com DENV2 exibiram alterações histopatológicas em todos os tecidos analisados, de modo semelhante aos casos fatais, principalmente no início da cinética no fígado e no final desta cinética no cérebro/cerebelo e pulmão.

- Foi detectado um aumento significativo dos níveis séricos de AST no tempo final da cinética após a infecção e os níveis de ALT mantiveram-se inalterados, o que sugere que o fígado não tenha sido um órgão afetado de forma grave nos camundongos infectados.

- O pulmão foi o órgão mais afetado, depois do cérebro, dentre os órgãos estudados.

- Após a inoculação intracerebral com DENV2, partículas virais infecciosas e/ou antígenos e RNA virais foram detectados tanto no sistema nervoso central quanto na circulação ou em órgãos periféricos, sugerindo que o vírus ultrapassou a barreira hematoencefálica, possibilitando a infecção e replicação em outros órgãos.

- A imunização com pcTPANS1 resultou na redução dos danos histológicos e aumento da resposta celular nos tecidos após o desafio com DENV2.

- Apesar da imunização com o pcTPANS1 não ter impedido completamente a liberação do vírus para circulação, poucos animais apresentaram viremia, demonstrando que a vacina, embora não esterilizante, exerceu um papel protetor.

## **7. PERSPECTIVAS**

- Investigar com mais detalhe a presença de antígenos virais no fígado e pulmão dos camundongos, com identificação das células infectadas através de marcações com anticorpos específicos;
- Detectar possíveis alterações nas populações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ nos diversos tecidos dos camundongos infectados, imunizados ou não.
- Analisar o perfil da resposta celular com a detecção de citocinas por imunofluorescência nos diferentes tecidos dos animais infectados, vacinados ou não.
- Realizar análises ultraestruturais dos tecidos hepático, pulmonar, cerebral e cerebelar dos animais infectados, vacinados ou não.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akey DL, Brown WC, Jose J, Kuhn RJ, Smith JL. Structure-guided insights on the role of NS1 in flavivirus infection. *Bioessays*. 2015; 37(5):489-94.
- Amaral DC, Rachid MA, Vilela MC, Campos RD, Ferreira GP, Rodrigues DH, et al. Intracerebral infection with dengue3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice. *J Neuroinflammation*. 2011;8:23.
- Amorim JH, Pereira Bizerra RS, dos Santos Alves RP, Sbrogio-Almeida ME, Levi JE, Capurro ML, et al. A genetic and pathologic study of a DENV2 clinical isolate capable of inducing encephalitis and hematological disturbances in immunocompetent mice. *PLoS One*. 2012; 7(9):e44984.
- Amorim JH, Alves RP, Boscardin SB, Ferreira LC. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. *Virus Res*. 2014; 181:53-60.
- An J, Kimura-Kuroda J, Hirabayashi Y, Yassui K. Development of a novel mouse model for dengue virus infection. *Virology*, 1999, 263: 70-77.
- Araújo F, Nogueira R, Araújo MS, Perdigão A, Cavalcanti L, Brilhante R, et al. Dengue in patients with central nervous system manifestations, Brazil, *Emerging Infectious Diseases*, vol. 18, no. 4, pp. 677–679, 2012.
- Ashhurst TM, Vreden Cv, Munoz-Erazo L, Niewold P, Watabe K, Terry RL, et al. Antiviral macrophage responses in flavivirus encephalitis. *Indian J Med Res*. 2013; 138(5):632-47.
- Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, García-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol*. 2009 Jun;83(11):5408-18.
- Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, Wiig H, Alitalo K. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med*. 2015;212(7):991-9.
- Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, Stuart DI, Grimes JM, Mancini EJ. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol*. 2009; 83(24):12895-906.
- Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003; 35(1):33-42.
- Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol*. 1998;161(11):6338-46.
- Avirutnan P; Punyadee N; Noisakran S; Komoltri, C; Thienneca S.; Auethavornanan K; et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J. Infect. Dis*. 2006; 193 (8): 1078-1088.
- Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *JEM* 2010;207 (4): 793-806.

- Azevedo AS, Gonçalves AJ, Archer M, Freire MS, Galler R, Alves AM. The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. *PLoS One*. 2013; 8(3):e58357.
- Azevedo AS, Yamamura AM, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M, Galler R, et al. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. *PLoS One*. 2011;6(7): e20528.
- Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol*. 2013; 3.
- Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3- specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 80(3):416-24.
- Barkhordarian A, Thames AD, Du AM, Jan AL, Nahcivan M, Nguyen MT, et al. Viral immune surveillance: Toward a TH17/TH9 gate to the central nervous system. *Bioinformatics* 2015;11(1): 047-054.
- Barrett AD. 2001. Current status of flavivirus vaccines. *Ann N Y Acad Sci*. 951:262-71.
- Barreto DF; Takiya CM; Schatzmayr HG; Nogueira RMR; Farias-Filho JC; Barth OM. Histopathological and ultrastructural aspects of mice lungs experimentally infected with dengue virus serotype 2. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102 (2): 175 - 182
- Barreto DF, Takiya CM, Paes MV, Farias-Filho J, Pinhão AT, Alves AM, et al. Histopathological aspects of Dengue-2 virus infected mice tissues and complementary virus isolation. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2004 Apr;36(2):121-30.
- Barth OM, Barreto DF, Paes MV, Takiya CM, Pinhão AT, Schatzmayr HG. Morphological studies in a model for dengue-2 virus infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(8):905-15.
- Basílio-de-Oliveira CA, Aguiar GR, Baldanza MS, Barth OM, Eyer-Silva WA, Paes MV. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. 2005; 9(4):341-347.
- Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med*. 2015;7(304):304ra141.
- Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, Bottazzi ME. 2013. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Transl Res*. 2013, 8 (13): S1931-5244.
- Beckett CG, Tjaden J, Burgess T, Danko JR, Tamminga C, Simmons M, et al. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine*. 2011 Jan 29;29(5):960-8.
- Bente, D. A. and R. Rico-Hesse. Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models*. 2006; 3(1): 97-103.
- Bhamarapravati N, Tuchinda P, Boonyapaknavik V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol*. 1967;61(4):500-10.
- Bhamarapravati N, Halstead SB, Sookavachana P, Boonyapaknavik V. Studies on dengue virus infection. 1. Immunofluorescent localization of virus in mouse tissue. *Arch Pathol*. 1964; 77:538-43.
- Bhamarapravati N. Hemostatic defects in dengue hemorrhagic fever. *Rev Infect Dis*. 1989; 4:S826-9.

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(25).
- Bhoopat L, Bhamarapravati N, Attasiri C, Yoksarn S, Chaiwun B, Khunamornpong S, et al. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 1996;14(2):107-13.
- Bodles-Brakhop AM, Heller R and Draghia-Akli R. Electroporation for the Delivery of DNA-based Vaccines and Immunotherapeutics: Current Clinical Developments. *Molecular Therapy* 2009; 17 4, 585–592.
- Boonpucknavig S, Vuttiviroj O, Boonpucknavig V. Infection of young adult mice with dengue virus type 2. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75(5):647-53.
- Bray M, Zhao BT, Markoff L, Eckels KH, Chanock RM, Lai CJ. Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis. *J Virol*. 1989; 63(6):2853-6.
- Brewoo JN, Kinney RM, Powell TD, Arguello JJ, Silengo SJ, Partidos CD, et al. Immunogenicity and efficacy of chimeric dengue vaccine (DENVax) formulations in interferon-deficient AG129 mice. *Vaccine*. 2012 Feb 14;30(8):1513-20.
- Brown AC ,2012. Neuroscience: Motor Systems, Primary Motor Cortex. [acesso em 12 jun 2015]. Disponível em: <<http://www.acbrown.com/neuro/Lectures/Motr/NrMotrPrmr.htm>>.
- Burke T. Dengue haemorrhagic fever: a pathological study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1968;62(5):682-92.
- Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg*. 1988; 38(1):172-80.
- Calvert JK, Helbig KJ, Dimasi D, Cockshell M, Beard MR, Pitson SM. Dengue Virus Infection of Primary Endothelial Cells Induces Innate Immune Responses, Changes in Endothelial Cells Function and Is Restricted by Interferon-Stimulated Responses. *J Interferon Cytokine Res*. 2015; 35(8):654-65.
- Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014; 10. pii: S0140-6736(14)61060-6.
- Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J. Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol*. 2013;12(9):906-19.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R. & Rice, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Ver. Microbiol*. 1990; 44: 649-688.
- Chambers TJ, Liang Y, Droll DA, Schlesinger JJ, Davidson AD, Wright PJ, et al. Yellow Fever Virus/Dengue-2 Virus and Yellow Fever Virus/Dengue-4 Virus Chimeras: Biological Characterization, Immunogenicity, and Protection against Dengue Encephalitis in the Mouse Model. *J. Virol*. 2003; 77 (6): 3655-3668
- Chang GJ, Davis BS, Hunt AR, Holmes DA, Kuno G. Flavivirus DNA vaccines: current status and potential. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 951:272-85.

- Chaturvedi UC, Dhawan R, Khanna M, Mathur A. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. *J Gen Virol.* 1991; 72 ( Pt 4):859-66.
- Chen HC, Lai SY, Sung JM, Lee SH, Lin YC, Wang WK, et al. Lymphocyte activation and hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J Med Virol.* 2004; 73(3):419-31.
- Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of denguevirus-induced hemorrhage. *J Virol.* 2007; 81(11):5518-26.
- Chimelli L, Hahn MD, Netto MB, Ramos RG, Dias M, Gray F. Dengue: neuropathological findings in 5 fatal cases from Brazil. *Clin Neuropathol.* 1990; 9(3):157-62.
- Chunhakan S, Butthep P, Yoksan S, Tangnaratchakit K, Chuansumrit A. Vascular leakage in dengue hemorrhagic Fever is associated with dengue infected monocytes, monocyte activation/exhaustion, and cytokines production. *Int J Vasc Med.* 2015;2015:917143.
- Chung HK; Dar IT; Chi SC; Chi KL; Shue SC; Yun FL. Liver biochemical tests and dengue fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992; 47: 265-270.
- Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G et al. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine.* 2010; 28: 2705-15.
- Clyde K, Kile JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.*, 2006; 80 (23): 11418-11431.
- Collier BA, Barrett AD, Thomas SJ. The development of Dengue vaccines. Introduction. *Vaccine.* 2011; 29(42):7219-20.
- Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhão AT, Barth OM, Queiroz JL, et al. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine.* 2006a; 24: 195-205.
- Costa SM, Freire MS, Alves AM. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine* 2006b; 24 (21): 4562-4.
- Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS et al. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology.* 2007; 358: 413-23.
- Costa SM, Yorio AP, Gonçalves AJ, Vidale MM, Costa EC, Mohana-Borges R, et al. Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS One.* 2011; 6(10):e25685.
- Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Hénin D, et al. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum Pathol.* 1999; 30(9):1106-10.
- Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews.* 2015; 39 (2) 155-170.
- Davis HL, McCluskie MJ. 1999. DNA vaccines for viral diseases. *Microbes Infect.* 1(1): 7-21.

- de Macedo FC, Nicol AF, Cooper LD, Yearsley M, Pires AR, Nuovo GJ. Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry. *Diagn Mol Pathol*. 2006; 15(4):223-8.
- da Silva LCC, Hetzel JL, Felicetti JC, Moreira JS, Camargo JJ, Porto N. *Pneumologia: Princípios e Prática Artmed*, 2012. [acesso em 18 jun 2015]. Disponível em:< <https://books.google.com.br/books?id=wubPoWphlrcC&pg=PT43&dq=tecido+pulmonar&hl=ptBR&sa=X&ei=OJxOVdDjMKLLsASIoIGIAG&ved=0CDsQ6AEwBw#v=onepage&q=tecido%20pulmonar&f=false>>
- de Souza LJ, Nogueira RM, Soares LC, Soares CE, Ribas BF, Alves FP, et al. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferase levels. *Braz J Infect Dis*. 2007;11(4):407-10.
- de Paula SO, França RFO, Lima DM, Dutra NR, de Paula MB, de Oliveira MD, et al. Evaluation of immunogenicity elicited from two DNA vaccine candidates that expresses the prM and Egenes of the dengue-3 virus. *Health*. 2010; 2 (11), 1298-1307.
- Department of Pathology College of Veterinary Medicine the University of Georgia Athens Normal structure and function, Lesson 1. *Respiratory Pathology*, 2010. [acesso em 18 jun 2015]. Disponível em:< [http://vet.uga.edu/ivcvm/courses/VPAT5316/01\\_respiratorypath/01\\_normal/normal02.html](http://vet.uga.edu/ivcvm/courses/VPAT5316/01_respiratorypath/01_normal/normal02.html)>.
- Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Schmidt AC, Whitehead SS. Development and clinical evaluation of multiple investigational monovalent DENV vaccines to identify components for inclusion in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. *Vaccine* 2011;29:7242–50.
- Edelman R, Hombach J. Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas: summary of a World Health Organization Technical Consultation. *Vaccine*. 2008; 26(33):4113-9.
- Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol*. 1997;142(5):897-916.
- Falconar AK. Monoclonal antibodies that bind to common epitopes on the dengue virus type 2 nonstructural-1 and envelope glycoproteins display weak neutralizing activity and differentiated responses to virulent strains: implications for pathogenesis and vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. 2008; 15(3):549-61.
- Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol*. 1990; 64(9):4356-63.
- Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res*. 2001; 2(1):33-46.
- França RF, Zucoloto S, da Fonseca BA. A BALB/c mouse model shows that liver involvement in dengue disease is immune-mediated. *Exp Mol Pathol*. 2010; 89(3):321-6.
- Freire JM, Santos NC, Veiga AS, Da Poian AT, Castanho MA. Rethinking the capsid proteins of enveloped viruses: multifunctionality from genome packaging to genome transfection. *FEBS J*. 2015;282(12):2267-78.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000;275:2247-2250)



- Figueiredo LTM. The Brazilian Flaviviruses. *Microbes and Infection*. 2000; 2 (13): 1643-1649.
- Forattini OP, Brito M. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*. 2003; 37 (5): 676-677.
- Gabel S, Koncina E, Dorban G, Heurtaux T, Birck C, Glaab E, et al. Inflammation Promotes a Conversion of Astrocytes into Neural Progenitor Cells via NF- $\kappa$ B Activation. *Mol Neurobiol*. 2015.
- Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol*. 1999; 73(5):3623-9.
- Gao G, Wang Q, Dai Z, Calcedo R, Sun X, Li G, Wilson JM. Adenovirus-based vaccines generate cytotoxic T lymphocytes to epitopes of NS1 from dengue virus that are present in all major serotypes. *Hum Gene Ther*. 2008; 19(9):927-36.
- Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia em cores*. ed. Guanabara koogan 1999. pg 278- 280 (pgs 426).
- Gonçalves, AJS. Mapeamento da resposta imune protetora induzida por uma vacina de DNA contendo o gene NS1 de dengue 2 [Dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro. Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.
- Gonçalves D, de Queiroz Prado R, Almeida Xavier E, Cristina de Oliveira N, da Matta Guedes, et al. Immunocompetent mice model for dengue virus infection. *ScientificWorldJournal*. 2012; 2012:525947.
- Ghosh A, Dar L. Dengue vaccines: challenges, development, current status and prospects. *Indian J Med Microbiol*. 2015;33(1):3-15.
- Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Nisalak A, Kurane I, Rothman AL, Ennis FA. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1999;180(5):1429-35.
- Green, S.; Rothman, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis*. 2006 Oct;19(5):429-36.
- Green AM, Beatty PR, Hadjilaou A, Harris E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol*. 2014; 426(6):1148-60.
- Guabiraba R, Marques RE, Besnard AG, Fagundes CT, Souza DG, Ryffel B, et al. Role of the chemokine receptor CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. *PLOS One*. 2010; 5(12):e15680.
- Guabiraba R, Ryffel B. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology*. 2014;141(2):143-56.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol*. 1998; 11:480–496.
- Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: the unholy Trinity of the 21st Century. *Trop. Med. And Health*. 2011; 39 (4): 3-11, 251-3.
- Gulati S, Maheshwari A. Atypical manifestations of dengue. *Trop Med Int Health*. 2007;12(9): 1087-95.
- Gupta M, Nayak R, Khwaja GA, Chowdhury D. Acute disseminated encephalomyelitis associated with dengue infection: a case report with literature review. *J Neurol Sci*. 2013; 15;335(1-2):216-8.

- Gurunathan S, Wu CY, Freidag BL, Seder RA. 2000a. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol*. 12(4):442-7. Review.
- Gurunathan, S.; Klinman, D.M.; Seder, R.A. 2000b. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Ann Rev Immunol*;18:927-74.
- Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 10;108(19):8003-8.
- Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* 2010;28:632-49.
- Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. 2011 Sep 23;29(42):7229-41.
- Guzman A, Istúriz RE. Update on the global spread of dengue. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2010; 36 (suppl 1): s40-42.
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(12 Suppl):S7-16.
- Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015; 385 (9966):453-65.
- Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I. Clinical laboratory responses to primary infection. *J. Infect. Dis*. 1973; 128 (1): 7-14.
- Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007; 370(9599):1644-52.
- Havens WP Jr. Hepatitis, yellow fever, and dengue. *Annu Rev Microbiol*. 1954;8:289-310.
- Heaton NS, Perera R, Berger KL, Khadka S, Lacount DJ, Kuhn RJ, et al. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(40):17345-50.
- Heaton NS, Randall G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe*. 2010b 8(5):422-32.
- Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol*. 1988; 69(8):2101-7.
- Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990; 3(4):376-96.
- Henriques HR, Rampazo EV, Gonçalves AJ, Vicentin EC, Amorim JH, Panatieri RH, et al. Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(7):e2330.
- Herrero LJ, Zakhary A, Gahan ME, Nelson MA, Herring BL, Hapel AJ, Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacol Ther*. 2013; 137(2):266-82.

- Hotta H, Murakami I, Miyasaki K, Takeda Y, Shirane H, Hotta S. Inoculation of dengue virus into nude mice. *J. Gen. Virol*, 1981, 52: 71-6.
- Huang KJ, Li SY, Chen SC, Liu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Lei HY. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol*. 2000;81( 9):2177-82.
- Huang, S.S., Li, I.H., Hong, P.D., Yeh, M.K. Evaluation of protective efficacy using a nonstructural protein NS1 in DNA vaccine-loaded microspheres against dengue 2 virus. *Int. J. Nanomed*. 2013; 8, 3161–3169.
- Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al. Liver Histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch*. 2001;438(2):107-15.
- Ishak KG, Walker DH, Coetzer JA, Gardner JJ, Gorelkin L. Viral hemorrhagic fevers with hepatic involvement: pathologic aspects with clinical correlations. *Prog Liver Dis*. 1982;7:495-515.
- Janssen HL, Bienfait HP, Jansen CL, van Duinen SG, Vriesendorp R, Schimsheimer RJ, et al. Fatal cerebral oedema associated with primary dengue infection. *J Infect*. 1998 ;36 (3) : 344-6.
- Jensen CJ, Massie A, De Keyser J. Immune players in the CNS: the astrocyte. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(4):824-39.
- Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally Infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*. 2004; 189(8):1411-8.
- Johns Hopkins Medicine. Gastroenterology & Hepatology. Anatomy. [acesso em 01 jul 2015] Disponível em: <[https://gi.jhsps.org/GDL\\_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL\\_Cat\\_ID=BB532D8A-43CB-416C-9FD2-A07AC6426961&GDL\\_Disease\\_ID=A6D10E80-887D-49A7-B3BB-0517D38CE757](https://gi.jhsps.org/GDL_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL_Cat_ID=BB532D8A-43CB-416C-9FD2-A07AC6426961&GDL_Disease_ID=A6D10E80-887D-49A7-B3BB-0517D38CE757)>.
- Johnson AJ, Roehrig JT. New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J Virol*. 1999; 73(1): 783-786.
- Hib J. Di Fiore *Histologia Texto e Atlas*. Ed. Guanabara Koogan. 2003; Páginas: 530 (302-303).
- Julander JG, Perry ST, Shresta S. Important advances in the field of anti-dengue virus research. *Antivir Chem Chemother*. 2011; 21(3):105-16
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica texto/atlas*. 10ª edição . Ed. Guanabara Koogan. 2004. Pg 344-356 (pgs 488).
- Kandel MD, JH Schwartz MD, TM. Jessell, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. *The Cerebellum. Principles of Neural Science, Fifth Edition*. 2012;pg 837. [acesso em 18 jun 2015]. Disponível em: <<http://www.ib.cnea.gov.ar/~redneu/2013/BOOKS/Principles%20of%20Neural%20Science%20-%20Kandel/gateway.ut.ovid.com/gw2/ovidweb.cgisidnjhkoalgmeho00dbookimagebookdb7c2fc~49.htm>>
- Kaufman BM, Summers PL, Dubois DR, Eckels KH. Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1987; 36(2):427-34.
- Krishnan MN, Sukumaran B, Pal U, Agaisse H, Murray JL, Hodge TW, Fikrig E. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *J Virol*. 2007; 81(9):4881-5.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002 Mar 8;108(5):717-25.

- Kularatne SA, Imbulpitiya IV, Abeysekera RA1, Waduge RN, Rajapakse RP, Weerakoon KG. Extensive haemorrhagic necrosis of liver is an unpredictable fatal complication in dengue infection: a postmortem study. *BMC Infect Dis.* 2014;14:141.
- Kumagai, Y.; Takeuchi, O.; Akira, S. 2008 TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev*; 60:795-804.
- Kümmerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol.* 2002; 76(10):4773-84.
- Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007; 30(5-6):329-40.
- Kuo CH, Tai DI, Chang-Chien CS, Lan CK, Chiou SS, Liaw YF. Liver biochemical tests and dengue fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47(3):265-70.
- Kutzler, M.A. & Weiner, D.B. 2008. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*; 9:776–88.
- Kyle JL, Balsitis SJ, Zhang L, Beatty PR, Harris E. Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. *Virology.* 2008 Oct 25;380(2):296-303.
- Laman JD, Weller RO. Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(4):840-56.
- Leão RN1, Oikawa T, Rosa ES, Yamaki JT, Rodrigues SG, Vasconcelos HB, et al. Isolation of dengue 2 virus from a patient with central nervous system involvement (transverse myelitis). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(4):401-4.
- Leong AS, Wong KT, Leong TY, Tan PH, Wannakrairot P. The pathology of dengue hemorrhagic fever, *Seminars in Diagnostic Pathology.* 2007; 24(4):227-36.
- Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.* 2002; 169(4):2215.
- Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, et al. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab Invest.* 2008 ;88(10):1079-89.
- Lindenbach BD, Rice CM. *Flaviviridae: The viruses and their replication.* Fields Virology, eds Knipe DM, Howley PM (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), 4th Ed, 2001; pp. 991–1041.
- Ling LM, Wilder-Smith A, Leo YS. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. *J Clin Virol.* 2007; 38(3):265-8.
- Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev.* 2011 Jan;239(1):62-84.
- Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. *Virology.* 1996; 220(1): 232–240.
- Mairuhu AT, Wagenaar J, Brandjes DP, van Gorp EC. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23(6):425-33.

- Malasit P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1987;18(3):316-20.
- Malhotra HS, Garg RK. Dengue-associated hypokalemic paralysis: causal or incidental?. *J Neurol Sci*. 2014; 340(1-2):19-25.
- Marchette NJ, Halstead SB, Falkler WA Jr, Stenhouse A, Nash D. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *J Infect Dis*. 1973;128(1):23-30.
- Marchiori E, von Ranke F, Zanetti G, Hochegger B. Dengue hemorrhagic fever: another cause of diffuse alveolar hemorrhage in immunocompetent patients. *Respir Med*. 2012;106(12):1807-8.
- Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View, *Clinical Microbiology*, 2009; 22 (4): 564-581.
- Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev*. 2008;225:300-13.
- McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J Biol Chem*. 2011; 286(25):22147-59.
- Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol.*; 1997; 16(4):204-8.
- Mikula, S., Trotts, I., Stone, J., and Jones, E.G. Internet-Enabled High-Resolution Brain Mapping and Virtual Microscopy. *NeuroImage*. 35(1):9-15. [acesso em 20 jun 2015] Disponível em: <<http://brainmaps.org/ajax-viewer.php?datid=107&sname=n11a> . 2007.>
- Miranda CH, Borges Mde C, Matsuno AK, Vilar FC, Gali LG, Volpe GJ, et al. Evaluation of cardiac involvement during dengue viral infection. *Clin Infect Dis*. 2013; 57(6):812-9.
- Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(7):2395-400.
- Morrison D, Legg TJ, Billings CW, Forrat R, Yoksan S, Lang J. A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naive adults. *J Infect Dis* 2010; 201:370-7.
- Mourão MP, Lacerda MV, Bastos MS, Albuquerque BC, Alecrim WD. Dengue hemorrhagic fever and acute hepatitis: a case report. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(6):461-4.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13-22.
- Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res*. 2013; 98(2):192-208.
- Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29:587-619.
- Murray NEA, Quam MB, Smith AW. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology* 2013; 5 299–309

- Nardi NB, Teixeira LAK, Silva EFÁ. Terapia gênica.. *Ciência & Saúde Coletiva* , v. 7, n.1, p. 109-116, 2002.
- Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2011; 5(11):e1397.
- Natarajan S. NS3 protease from flavivirus as a target for designing antiviral inhibitors against dengue virus. *Genet Mol Biol.* 2010 Apr;33(2):214-9.
- Nemésio H, Palomares-Jerez F, Villalaín J. NS4A and NS4B proteins from dengue virus: membranotropic regions. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(11):2818-30.
- Nishioka et al., 1974Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of duengue type 2 in Rio de Janeiro, *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990; 85: 253.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(9):1376-81.
- Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica.* 2007;22(5):358-63.
- Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(3):255-6.
- Oishi K, Inoue S, Cinco MT, Dimaano EM, Alera MT, Alfon JA, et al. Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *J Med Virol.* 2003; 71(2): 259-64.
- Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao HM, Duncan A, Villinger F, Ansari AA et al. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood.* 2010; 115(9):1823-34.
- Osanaí CH, Travassos Da Rosa AP, Tang AT, Do Amaral RS, Passos AD. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1983; 25 (1): 53-54.
- Osorio JE, Brewoo JN, Silengo SJ, Arguello J, Moldovan IR, Tary-Lehmann M, et al. Efficacy of a tetravalent chimeric dengue vaccine (DENVax) in *Cynomolgus* macaques. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(6):978-87.
- Pacheco MM, García PM, Diego MÁP. Órganos animales. Sistema nervioso. *Atlas de Histología Vegetal y Animal.* Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología, Universidad de Vigo España . 2014. [acesso em 19 jun 2015]. Disponível em: < [http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada\\_o\\_a\\_01palio.php](http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_01palio.php) >.
- Paes MV, Pinhão AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, Nogueira AC et al. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology.* 2005; 338(2):236-46.
- Paes MV, Lenzi HL, Nogueira AC, Nuovo GJ, Pinhão AT, Mota EM, et al. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest.* 2009; 89(10):1140-51.
- Pagliari C, Quaresma JA, Fernandes ER, Stegun FW, Brasil RA, de Andrade HF Jr, et al. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever: contribution to the study of human liver lesions. *J Med Virol.* 2014; 86(7):1193-7.
- Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q.* 1997; 50(3-4):161-9.

- Porter KR, Ewing D, Chen L, Wu SJ, Hayes CG, Ferrari M, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a vaxfectin-adjuvanted tetravalent dengue DNA vaccine. *Vaccine* 2012;30:336-41.
- Potisopon S, Priet S, Collet A, Decroly E, Canard B, Selisko B. The methyltransferase domain of dengue virus protein NS5 ensures efficient RNA synthesis initiation and elongation by the polymerase domain. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(18): 11642–11656.
- Póvoa TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One.* 2014; 9(4):e83386.
- Puccioni-Sohler M, Soares CN, Papaiz-Alvarenga R, Castro MJ, Faria LC, Peralta JM. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immuneresponse. *Neurology.* 2009 ;73(17):1413-7.
- Puccioni-sohler M, Rosadas C. Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2015; 73(8): 698-703.
- Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(2):91-101.
- Reis TJ. A febre dengue in Curitiba. *Gazeta Médica da Bahia.* 1896; 7: 163-266.
- Rodenhuis-Zybert, I.; Wilschut, J.; Smit, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol. Life Science.* 2010; 67(16):2773-2786.
- Rodrigues RS, Brum AL, Paes MV, Póvoa TF, Basilio-de-Oliveira CA, Marchiori E, et al. Lung in dengue: computed tomography findings. *PLoS One.* 2014;16,9(5):e96313.
- Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, de Souza WV, Marques ET, Cummings DA. From Re-Emergence to Hyperendemicity: The Natural History of the Dengue Epidemic in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.*; 2011; 5(1): e935.
- Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(5):720-4.
- Ross MH, Romrell LJ. *Histologia Texto e Atlas, 2a. edição.* Panamericana, 1993.
- Ross TM. Dengue virus. *Clin Lab Med.* 2010; 30(1):149-60.
- Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology.* 1999; 257(1):1-6.
- Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest,* 2004; 113(7): 946-951.
- Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):532-43.
- Rubin E., Farber JL. *Patologia, 3.ed.* Guanabara Koogan, 2002.
- Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, et al. Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multipledoses. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:264-72.

- Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* 2012;380:1559-67.
- Salazar MI, Pérez-García M, Terreros-Tinoco M, Castro-Mussot ME, Pérez-Ramírez DJ, Ramírez-Reyes AG, et al. Dengue virus type 2: protein binding and active replication in human central nervous system cells. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:904067.
- Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, et al. Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(3):238-42.
- San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(1):128-35.
- Sariol CA, Pelegrino JL, Martínez A, Arteaga E, Kouri G, Guzmán MG. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61(6):994-1000.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986; 81: 245-246.
- Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol*. 1987; 68 (3):853-7.
- Schlesinger JJ, Foltzer M, Chapman S. The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. *Virology*. 1993; 192: 132–141.
- Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2006, 100(7): 608-614.
- Setlik RF, Ouellette D, Morgan J, McAllister CK, Dorsey D, Agan BK. Pulmonary hemorrhage syndrome associated with an autochthonous case of dengue hemorrhagic fever. *South Med J*. 2004; 97(7):688-91.
- Shiao MF, Chang FY, Hou SC. Complement pathway activity in serum from patients with classical dengue fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992; 86 (6): 672-5.
- Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol*. 2004; 78(6):2701-10.
- Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol*. 2006; 80(20): 10208-10217.
- Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen VV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*., 2012; 366(15):1423-32.
- Sinha G. Sanofi's dengue vaccine first to complete phase 3. *Nat Biotechnol*. 2014;32(7):6056.
- Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*. 2011;3(2):160-71.
- Smith DR & Khakpoor A. Involvement of the liver in dengue infections, *Dengue Bulletin*, 2009; (33): 75-86.



- Smith DR, Holbrook MR, Gowen BB. Animal models of viral hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2014 Dec;112:59-79.
- Solbrig MV, Perng GC. Current neurological observations and complications of dengue virus infection. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2015; 15(6):29.
- Souza LJ, Alves JG, Nogueira RM, Gicovate Neto C, Bastos DA, Siqueira EW, et al. Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients with dengue fever: analysis of 1,585 cases. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8(2):156-63.
- Srikiatkachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanarooj S, Libraty DH, Green S, Ennis FA, Rothman AL. Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *J Virol.* 2007 Feb;81(4):1592-600.
- Srikiatkachorn A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever, *Thromb Haemost* 2009; 102: 1042–1049.
- Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol.* 2006; 87(10):2755-66
- Sundaram C, Uppin SG, Dakshinamurthy KV, Borgahain R. Acute disseminated encephalomyelitis following dengue hemorrhagic fever. *Neurol India.* 2010; 58(4):599-601.
- Sun W, Edelman R, Kanesa-Thanan N, Eckels KH, Putnak JR, King AD, et al. Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:24–31.
- Sun DS1, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, Yu CC, Chang HH. Antiplatelet Autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause Thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost.* 2007;5(11):2291-9.
- Sung JM, Lee CK, Wu-Hsieh BA. Intrahepatic infiltrating NK and CD8 T cells cause liver cell death in different phases of dengue virus infection. *PLoS One.* 2012;7(9):e46292.
- SVS - Serviço de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2011. [acesso em 07 jul 2015] Disponível em: <<http://bvsm.saude.gov.br/bvs/publicacoes/planonacionalsaude20122015>>.
- SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde, Portal da saúde - Ministério da saúde . Dengue. 2015ª. [acesso em 07 jul 2015] Disponível em:< <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue> >
- SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, Portal da saúde - Ministério da saúde . Boletim epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 11. 2015b; 46 (11). [acesso em 29 ago 2015]. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/29/2015-013---Boletim-Dengue-SE11-2015.pdf>>
- Teixeira MG, Siqueira JB Jr, Ferreira GL, Bricks L, Joint G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Dec 19;7(12):e2520.
- Thisyakorn U, Thisyakorn C. Latest developments and future directions in dengue vaccines. *Ther Adv Vaccines.* 2014; 2(1):3-9.
- Trung DT, Thao le TT, Hien TT, Hung NT, Vinh NN, Hien PT, et al. Liver involvement associated with dengue infection in adults in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(4):774-80.

- Ulmer, J.B.; Wahren, B.; Liu, M.A. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol. Med.* 12, 216–222.
- Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol.* 2006; 87(9):2605-14.
- Valdes I, Bernardo L, Gil L, Pavon A, Lazo L, et al. A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. *Virology.* 2009; 394: 249–58.
- Van Der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R, Strauss JH. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol.* 2000; 74(17):8094-101
- Van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* 2008;4(12):e1000244.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000; 181(1):2-9.
- Velandia-Romero ML1, Acosta-Losada O, Castellanos JE. In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. *J Neurovirol.* 2012 Oct;18(5):374-87.
- Wan SW, Lin CF, Yeh TM, Liu CC, Liu HS, Wang S, et al. Autoimmunity in dengue pathogenesis *Formos Med Assoc.* 2013; 112(1):3-11.
- Wang CC, Liu SF, Liao SC, Lee IK, Liu JW, Lin AS, et al. Acute respiratory failure in adult patients with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(1):151-8.
- Wang E, Ni H, Xu R, Barrett ADT, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC. Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *Journal of Virology.* 2000; 74 (7), 3227-3234.
- WebStudy. Chapter 22: The Digestive System Accessory Organs, Chemical Digestion and Absorption. The liver. [acesso em 03 jul 2015]. Disponível em: <[https://cms.webstudy.com/Webstudy/FileSystem/testovaci/GetFile/293875/Ch%2022/Ch22b/Ch22b\\_print.html](https://cms.webstudy.com/Webstudy/FileSystem/testovaci/GetFile/293875/Ch%2022/Ch22b/Ch22b_print.html)>.
- Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol.* 1996;6(3):275-88.
- Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*, 2011; 23,29 (42):7221-8.
- WHO, World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. .1997; 2nd edition. Geneva: World Health Organization.
- WHO, World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, new edition. 2009.
- WHO, World health Organization. Immunization, Vaccines and Biologicals. 2014 <http://www.who.int/immunization/diseases/dengue/en/>.

- Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, Leung L, Otten GR, Thudium K, Selby MJ, Ulmer JB. 2000. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J Immunol.* 164(9): 4635-4640.
- Wise J. Trial results raise hope for dengue fever vaccine. *BMJ.* 2015;350:h141.
- Wu, S-F., Liao, C-L., Lin, Y-L., Yeh, C-T., Chen, L-K., Huang, Y-F., Chou, H-Y., Huang, J-L., Shaio, M-F., Sytwu, H-K., 2003. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine* 21, 3919–3929.
- Yauch LE, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res.* 2008; 80(2): 87-93.
- Xie X, Zou J, Wang QY, Shi PY. Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral Res.* 2015;19,118:39-45.
- Xie X, Gayen S, Kang C, Yuan Z, Shi PY. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *J Virol.* 2013 Apr;87(8):4609-22.
- Zellweger RM, Shresta S. Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. *Front Immunol.* 2014; 5: 151.
- Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses.* 2012 Jan;4(1):62-82.

## 9. APÊNDICES

### 9.1. Apêndice 1:

# Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route

Oliveira ERA<sup>1,§</sup>, Amorim JFS<sup>1,§</sup>, Paes MV<sup>1</sup>, Azevedo AS<sup>1</sup>, Gonçalves AJS<sup>1</sup>, Costa SM<sup>1</sup>, Mantuano-Barradas M<sup>1</sup>, de Meis J<sup>2</sup>, Basílio-de-Oliveira C.A<sup>3</sup>, Nogueira ACMA<sup>1</sup> and Alves AMB<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biotechnology and Physiology of Viral Infections, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup>Pathological Anatomy, Hospital Gaffrée Guinle, Federal University from the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), RJ, Brazil;

<sup>§</sup>These authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author, [ada@ioc.fiocruz.br](mailto:ada@ioc.fiocruz.br)

### Abstract

The lack of immunocompetent animal model for dengue research mimicking the human disease is a limitation. Inoculation by the intracerebral route of neuroadapted dengue strains in mice is normally lethal and provides a straightforward readout parameter for vaccine tests. However, the systemic effects of infection and the immune response elicited in this model remain poorly described. In the present work, BALB/c mice infected by the intracerebral route with neuroadapted DENV2 exhibited several evidences of systemic involvement. DENV-inoculated mice presented virus infective particles in the brain followed by viremia, especially in late stage of infection. Infection induced cellular and humoral responses, with presence of activated T cells in the spleen and blood, lymphocyte infiltration and tissue damages in the brain and liver, and an increase in the serum levels of some pro-inflammatory cytokines. Data highlight an interplay between the central nervous system commitment and peripheral effects under this experimental condition.

*Key words: dengue; mouse model; intracerebral infection; immune response; central nervous system.*

## Introduction

Dengue is an acute systemic viral disease that represents an escalating public burden, nowadays considered as the most relevant arthropod-borne illness. The virus, concentrated among tropical and subtropical regions worldwide, is transmitted mainly by *Aedes* mosquitoes, which put at risk of infection approximately half of the world's population. It is estimated that 390 million people are infected with dengue annually, of which 96 million manifest the symptoms of the disease resulting around 20 thousand deaths (Gubler, 2012; Bhatt et al., 2013). Dengue virus (DENV) circulates as four distinct serotypes (DENV1 to 4) and infections can be oligosymptomatic or result in a mild flu-like illness known as dengue fever (DF). The life-threatening forms of the disease, dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS), occur in a minority of DF cases and exhibit manifestations such as plasma leakage, thrombocytopenia and hemorrhage, which can evolve to hypovolemic shock (Martina et al., 2009; Chuansumrit and Chaiyaratana, 2014). In addition, complications of dengue affecting specific organs and systems, such as the brain, peripheral nerves, liver, lung and heart, have recently been reported (Carod-Artal et al., 2013; Póvoa et al., 2014; Berkowitz et al., 2015). As there are no effective antiviral alternatives or a vaccine available to control dengue virus infection, currently, the countermeasures rely basically on vector control, educational programs and symptomatic treatments.

The lack of an immunocompetent animal model that mimics all the human clinical aspects of dengue is recognized as a key obstacle on the role of understanding the disease immunity and on vaccine development. This fact lead the scientific community to use alternative animal approaches for dengue research, including mouse-human chimeras, immunocompromised mice or models using non-physiological infection routes (Yauch and Shresta, 2008). These experimental models are very useful for investigating the mechanisms involved in the disease, but its use for testing vaccines can have some restrictions, since these mice may respond differently from immunocompetent animals. An immunocompetent mouse approach in which a mouse brain adapted virus, original from New Guinea and Hawaii dengue outbreaks, is intracerebrally injected in animals (Sabin and Schlesinger, 1945) has been extensively used in anti-dengue vaccine evaluation (Porter et al., 1998; Valdes et al., 2009; Clements et al., 2010; Azevedo et al., 2011; Costa et al., 2011). Nevertheless, based on symptoms generally observed in these mice (paralysis) and the inoculation route, this animal approach is sometimes described as non-relevant when considering vaccine testing (WHO, 2013; Plummer and Shresta, 2014). However, in humans, even though neurological signs may be statistically underestimated by clinical evaluations during dengue outbreaks, several forms of central and peripheral nervous system impairments have been described in patients with dengue (Sumarmo et al., 1978; Row et al., 1996; Misra and Kalita, 2006). A meta-analytical study of 15 reports considering symptoms as restlessness, irritability, dizziness, drowsiness, stupor, coma or convulsion, revealed different levels of correlation between these neurological signs and DSS. Strong correlations of encephalopathy with DSS were detected in five studies from Thailand and in a summary of other seven case-control studies (Huy et al., 2013). Important neurological manifestations were also reported in many dengue fatal cases (Kho et al., 1981; Sumarmo et al., 1983; Chimeli et al., 1990; Miagostovich et al., 1997), what emphasizes a possible close connection between the central nervous system (CNS) dysfunction and patients with severe dengue.

Despite the historical application of the intracerebrally-inoculated immunocompetent mouse approach for anti-dengue vaccine testing, protection was measured basically by survival/morbidity endpoints. Little is known about other possible effects induced after an intracerebral (i.c.) inoculation with DENV, regarding systemic aspects and the elicited immune response. On this purpose and based on the importance of an immunocompetent environment to study DENV infection and the efficacy of vaccines, here we aimed to investigate more deeply BALB/c mice intracerebrally inoculated with the mouse brain adapted DENV2 NGC strain. Infective virus particles were detected in the brain of these animals as well as in the circulation, mainly in late stage of infection. Infection induced activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, detected in spleen and blood samples. T cell infiltrates were also observed in the brain and liver, which correlated with tissue damages in

these organs. In addition, a humoral immune response was elicited, with activation and production of dengue specific antibodies by B lymphocytes. Moreover, animals exhibited increased serum levels of pro-inflammatory cytokines. Taken together, this study brings new aspects involving immunological features of the studied mouse model and highlights an interplay between the CNS commitment and the peripheral effects under this experimental condition.

## Results

### *Morbidity and mortality of BALB/c mice intracerebrally infected with DENV2*

In the experimental mouse model using BALB/c animals inoculated by the i.c. route with 40 LD<sub>50</sub> of a mouse-brain adapted DENV2 virus (NGC strain), we observed a high mortality rate (90 %), with deaths occurring from the 7<sup>th</sup> to the 15<sup>th</sup> day after infection (d.a.i.) (Fig. 1A). All mock-injected mice survived the procedure (mock and virus-infected animal groups were significantly different,  $p < 0.0001$ ). After that, we verified the relationship between the occurrence of deaths and morbidity manifestation, mainly hind leg paralysis and/or alteration of spinal cord. For this purpose, mortality curves were built considering deaths preceded or not by symptoms related to central nervous system (CNS) dysfunction. Morbidity were evaluated at least 16 h before deaths and we observed that a subset of DENV-infected mice (54.7 %) died after exhibiting signs of CNS dysfunction while another group (35.3 %) succumbed without exhibiting any apparent clinical signs (Fig. 1B). In general, deaths preceded by clinical signs were broadly distributed in time course (from 8 to 15 d.a.i.), while deaths without morbidity were more concentrated in the early stages of infection (from 7 to 10 d.a.i.). Therefore, data suggest that even though there is an important component leading to death clearly associated with CNS commitment, lethality, in several cases, is not necessarily preceded by the observed neurologic dysfunctions.

### *Detection of DENV2 in infected mice*

The presence of infective DENV2 particles was investigated by plaque assay in Vero cell monolayers using brain, liver and serum samples from virus-inoculated BALB/c. All animals inoculated with DENV2 presented infective virus particles in the brain. Viral titers were significantly high throughout the entire evaluated period, although a decrease was observed in days 5 and 7 (Fig. 2). As expected, the control group (mock) showed no viral plaque formation.

Viremia was detected in animals infected with DENV2, yet in low magnitude and not in all serum samples (Table 1). The number of DENV2 positive serum samples gradually increased along the kinetic study. In the first day after infection, only one animal out of five showed viremia, while in the last tested points (9-11 d.a.i.) we observed five out of seven dengue positive serum samples. According to these results, the brain seemed to be the main organ for virus replication, however, infective virus particles were also detected in the circulation.

### *Activated T cells in spleen and blood*

The levels of T cell populations and the presence of activated subpopulations were investigated in spleen and blood samples of DENV2-infected BALB/c mice. The flow cytometry gate strategy applied for this analysis is described in Fig. 3. No differences were detected on the percentages of TCD4<sup>+</sup> cells analyzed in splenocytes collected at all time points (1, 3, 5, 7 and 9-11 d.a.i.) when compared to non-infected controls (Fig. 4A). Regarding the TCD8<sup>+</sup> subset, a percentage increase of this population was observed at the 5<sup>th</sup> d.a.i. and this effect remained throughout the rest of the experiment. We considered as a T cell activation marker the expression of CD45RB<sup>low</sup> on the cell surface. In this context, we found that percentages of both

TCD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> and TCD8<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> splenocytes increased after DENV infection (Fig. 4A). At the 3<sup>rd</sup> d.a.i., approximately 50 % of TCD4<sup>+</sup> cells were CD45RB<sup>low</sup>, whereas the activated TCD8<sup>+</sup> subpopulation, significantly detected only at the 5<sup>th</sup> d.a.i., represented about 20 % of the TCD8<sup>+</sup> subset. When the same analysis was performed in blood samples, we observed a similar pattern. Percentages of TCD4<sup>+</sup> cells did not vary during the investigated period, while TCD8<sup>+</sup> subset was higher in day 5 when compared to non-infected samples (Fig. 4B). Concerning activated T lymphocytes, percentages of TCD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> cells increased from day 3 onwards reaching a peak level at the 7<sup>th</sup> d.a.i. (about 40 % of the TCD4<sup>+</sup>), whereas the percentage of TCD8<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> only increased significantly at 5 d.a.i. (25 % of the TCD8<sup>+</sup>) (Fig. 4B). Levels of activated T cell subpopulations also increased significantly when analyzed by absolute counts (Fig. 4C). Negative control was performed using blood and spleen samples of mock-infected mice, measured at the 5<sup>th</sup> d.a.i., and no differences were found when compared to non-infected animals (day 0) (data not shown). Taken together, results indicated that DENV infection by the i.c. route lead to T cell activation.

#### *T cell infiltrates and histopathological aspects of the brain of infected mice*

Since the main clinical manifestations in this mouse model are related to CNS commitment, the presence of T cell infiltrates were investigated in the brain of infected animals. For this purpose, animals on days 9 to 11 after infection with DENV2 (all of them showing clinical signs) were elected for this analysis and compared with early-infected (3<sup>rd</sup> d.a.i) and mock-infected mice. To ensure the feasibility of lymphocyte detection from brain samples by flow cytometric analysis, additional controls were made (“spiked sample”), in which brains from non-infected animals were macerated together with a small quantity of splenocytes obtained from the same animals. As indicated in Fig. 5A, splenocytes were successfully recovered from the spiked sample, thus confirming the usefulness of the applied protocol. After infection, a T cell population, including CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>, was detected only in samples obtained at 9-11 days (Fig. 5A and B). In accordance to this observation, lymphocyte infiltrates were also seen in brain tissues of animals at the 10<sup>th</sup> d.a.i., as determined by histological analysis. In this study, we observed diffuse mononuclear cell infiltrates in pia mater and molecular layer, as well as perivascular leukocyte cell migration inside interstitial temporal cortex (Fig. 6B and C). Interstitial hemorrhage was an additional alteration detected in brain tissues of infected mice (Fig. 6D). All together, both analyses showed that, in the present mouse model, severe symptomatic manifestations and T cell infiltrates in the brain occur simultaneously and may be somehow related.

#### *T cell infiltrates detected in the liver and the commitment of this organ during infection*

Besides studies concerning T cell infiltrates in the brain of infected mice, we also investigated the presence of lymphocyte infiltrates in the liver of these animals. Although mice were virus challenged by the i.c. route, the liver was evaluated since this organ is considered as an important target in dengue disease. Flow cytometry analysis was carried out according to Fig. 7. A significant increase on the percentages of TCD8<sup>+</sup> lymphocytes was detected in animals at 9<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> d.a.i., when compared to non-infected controls, while no differences on the percentages of TCD4<sup>+</sup> population was detected (Fig. 8 top). On the other hand, once considering activated (CD45RB<sup>low</sup>) and effector (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup>) subpopulations, we observed an increase in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells during the same period when compared to the controls. The percentage of the TCD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup> subpopulation was already increased at the 3<sup>rd</sup> d.a.i. (Fig. 8 bottom). These data were supported by histological findings, in which hepatic tissues of infected animals presented lymphocyte infiltrates either around the portal space or distributed in parenchyma, mainly in late stages of infection (Fig. 9B and C). Microsteatosis, necrosis and circulatory dysfunctions, such as hemorrhage and edema, were also characterized in interstitial parenchyma since the beginning of infection (one day after virus inoculation) (Fig. 9D and E). As expected, in control mice (mock-infected) the hepatic tissue exhibited regular and preserved structures (Fig. 9A). Consistent with histopathological observations, serum levels of AST significantly

increased in mice after 9-11 d.a.i. (Fig. 10). After all, these data indicate that the liver is affected in the present mouse model, thus confirming that the virus infection by the i.c. route can evolve to a systemic commitment.

#### *B cell response in DENV infected mice*

In order to investigate the participation of the host humoral immune response during infection, we first analyzed the expression of IgD in the surface of B220<sup>+</sup> cells using flow cytometry. Populations of higher (B220<sup>+</sup><sub>hg</sub>) or lower (B220<sup>+</sup><sub>lg</sub>) internal complexity, as determined by side scatter parameter (SSC), were analyzed separately since this phenotypic parameter can reflect an increase of synthesis and activation of cells (Fig. 11A). In this approach, we measured the down regulation of IgD on the surface of these cells, as an evidence of B cell differentiation. We observed, in blood and spleen samples, that DENV infection lead to an increase of B220<sup>+</sup><sub>hg</sub>IgD<sup>-</sup> cell percentages in late stages of the kinetic study (9-11 d.a.i.), when compared to controls (Fig. 11B and C). No differences were observed considering the B220<sup>+</sup><sub>lg</sub>IgD<sup>-</sup> percentages between mock and infected groups (data not shown). ELISA assays using the DENV2 NS1 as solid-phase antigen were additionally performed in order to investigate the antibody secreting cell response against this virus protein. Consistent with the flow cytometry experiments described above, anti-NS1 IgM antibodies were detected in the 5<sup>th</sup> d.a.i., reaching titers of 1/200 in the final points of the study (9<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> d.a.i.), whilst anti-NS1 IgG antibodies were observed only in late stages of infection, with titers of approximately 1/700 (Fig. 11D). Thus, results indicate the participation of the humoral immunity in response to DENV infection by the i.c. route, with activation and production of antibodies by B lymphocytes.

#### *Pro-inflammatory cytokines present in blood of infected BALB/c mice*

After showing the participation of T and B cell response elicited by the intracerebral infection, the quantification of pro-inflammatory cytokines in blood was our next step to characterize this mouse model. Plasma samples were extracted from DENV-infected animals in days 0, 1, 3, 5, 7 and 9-11 after infection and tested for IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-10 and IL-6 by cytometric bead array (CBA) technique. Following 24 h of virus challenge, levels of IL-12p70, TNF- $\alpha$  and MCP-1 significantly increased when compared to non-infected controls. Levels of all these cytokines dropped below limits of detection in the next evaluated days, but IL-12p70 and TNF- $\alpha$  increased again in the 7<sup>th</sup> d.a.i. (Fig. 12). Although levels of IL-10 and IL-6 were mostly beneath the detection limits, IL-10 showed a behavior similar to IL-12p70 and TNF- $\alpha$ , exhibiting peaks at days 1 and 7 after infection. Regarding IFN- $\gamma$ , a significant peak was detected at the 7<sup>th</sup> d.a.i. In a brief conclusion, these cytokine profiles suggest the activation of innate mechanism at the beginning of infection, followed by an induction of the adaptive immunity, as seen by the INF- $\gamma$  increase at late stages of the study.

### **Discussion**

The application of a neuroadapted dengue strain to generate a lethal infection after intracerebral inoculation in mice has been used since Sabin and Schlesinger (1945) and provides a very straightforward readout parameter for vaccine testing. The protective potential of a proposed vaccine or antiviral can be directly assessed by its capability or not to prevent morbidity and mortality among challenged animals. However, little is known about the systemic effects and the immune mechanisms involved during the virus infection. Therefore, the present work was conducted in regards to better understand this mouse model. Under our experimental conditions, in which BALB/c mice received the DENV2 NGC by the i.c. route, we found that usually at the 7<sup>th</sup> day of infection mice start to exhibit paralysis and hunch back posture, which are apparently the main symptoms within infected groups. After the appearance of this condition, the clinical



signs generally evolved to death. Curiously, we observed that a relevant fraction of infected mice succumbed to the infection differently, without showing any apparent CNS commitment. We hypothesized that distinct mechanisms of pathology and immunity, yet to be investigated, may lie behind such differences in morbidity in this inbred and isogenically-based animal model.

The first general discussion in this work is concerned on the typical clinical signs observed among infected mice. It is commonly discussed in the literature that the neurovirulence induced after DENV infection in mice would represent a major caveat in the determination of an appropriate model to study the disease (Yauch and Shrestha, 2008; Sarathy et al., 2015). In fact, some authors defend that the involvement of CNS in DENV infections is not relevant in humans due to its rare occurrence (Patey et al., 1993; Lum et al., 1996). However, other reports showed that the CNS involvement with dengue actually is not so uncommon. From 150 fatal cases in Brazil (due to suspected infectious disease), 84 patients presented DENV in the serum and 41 had the virus isolated from the cerebral spinal fluid (CSF) (Araújo et al., 2012). Studies in India also reported a relevant incidence of neurologic complications (2.6 %) in infected patients (Koshy et al., 2012) and seizures (24%) in individuals with dengue encephalitis (Misra and Kalita, 2009). Although diagnostic criteria for dengue encephalitis have been proposed, they are controversial because detection of either viral RNA or specific IgM antibodies in the CSF may be disease-course dependent (Carod-Artal et al., 2013; Soares and Puccioni-Sohler, 2013). In consequence, this can eventually result in a wrong perception of the CNS involvement with dengue. In mouse models for dengue disease, paralyzes are also observed even when using non-intracerebral infection routes or non-neuroadapted virus strains. For example, A/J mice, engrafted SCID mice and AG129 mice can exhibit paralysis after infection with DENV (Lin et al., 1998; Shrestha et al., 2004; Zellweger et al., 2010; Plummer and Shrestha, 2014). Based on these observations, we may consider that the neuroadaptation of DENV strains impacted mainly in the ability to induce lethality in immunocompetent mice, but the neurotropism of DENV in these animals seems to be a natural characteristic of this virus.

Initially, to investigate the intracerebrally infected animals, we measured the presence of infective virus particles in the brain and bloodstream. As expected, considerable amounts of virus were found in brain tissues collected in all time points (1 to 9-11 d.a.i.). Interestingly, the number of virus particles significantly decreased in the 5<sup>th</sup> d.a.i., after which gradually increased until the end of the evaluation (9-11 d.a.i.). In addition to that, T cell infiltrates were found in the CNS (characterized by flow cytometry and histological analysis) of animals in late stages of infection (9-11 d.a.i.). Apart from other potential protective mechanisms in the CNS, the increase of virus titers in the brain in late stages of infection, correlated with T cell infiltrates in this organ, suggests an ongoing peripheral cellular immune response. These results may contradict traditional theories, because the CNS is considered an immune-privileged tissue protected by a specific vessel structure, the blood-brain barrier (BBB), which in turn should block the migration of lymphocytes into this area. However, studies already demonstrated that upon infection or traumatic injury in the CNS, various immune cells are recruited to the affected space, trespassing the BBB (Arima et al., 2012; Kamimura et al., 2013). It is important to note that mock-inoculated animals, which also had the traumatic injury of injection, did not show tissue damages or cell infiltrates as observed in the brain of infected animals, thus reinforcing the direct effect of virus infection.

The spread of infective virus particles to the circulation in this animal model, although in a low magnitude, was also an important finding, which can explain the systemic effects of infection we have observed. On the other hand, we found T cell infiltrates and activated/effector T cell phenotypes present in liver tissues of infected mice. Taken together, these results suggest that the virus present in the circulation could affect peripheral organs. Other studies have also shown that the liver is an important target organ during DENV infection in mice. C57BL/6 mice infected intravenously (Sung et al., 2012) and BALB/c mice that received the virus by the subcutaneous (França et al., 2010), intraperitoneal (Paes et al., 2005) or intravenous (Paes et al. 2009) routes presented hepatic alterations. The major hepatic alterations observed in our study were steatosis, necrosis, areas of hemorrhage and edema/plasma leakage, which are similar to the effects described in fatal human cases (Bhamarapravati et al. 1967; Burke T, 1968; Couvelard et al., 1999; Huerre et

al., 2001; Basílio-de-Oliveira et al., 2005; Martina et al., 2009; Póvoa et al., 2014) as well as in other mouse models (Paes et al., 2005, 2009). Moreover, a significant increase of AST levels was detected in serum of infected mice at late stages of infection. In congruence to these findings, it was also reported that an increase of this liver enzyme occurs both in humans and mice due to dengue infection (Nguyen et al., 1997, Souza et al., 2004, Paes et al., 2005, 2009). Still considering our studied mouse model, diffuse mononuclear cell infiltrates in pia mater and in the molecular layer was found in the brain of infected mice. Perivascular leukocyte cell migration was also characterized in the temporal cortex. Those findings were also seen in other reports of mouse models for dengue disease concerning different serotypes (Bordignon et al., 2008, Velandia-Romero et al., 2012, Souza et al., 2013).

After the intracerebral infection of BALB/c mice, apart from the effects described above, we also found activated T cells in spleen and blood of these animals, as well as a humoral and cytokine responses, both usually described in dengue cases (Rothman, 2011). One assumption that would explain the systemic involvement after the i.c.-infection, is that during inoculation, the mechanic damage would also result in virus spread to the circulation. This way, the virus would infect other locations and/or antigens could reach lymphoid organs. Another possible explanation would be the commitment of the BBB due to the establishment of virus infection leading to virus spread. A third supposition to analyze this scenario involves a physiological communication between the CNS environment and the periphery. Classically, we understand that the relative immune privilege of the CNS is based upon a lack of access of cells and antigens from the brain to secondary lymphoid organs (Engelhardt and Coisne, 2011). Even though no classical lymph vessels are present in the CNS, several exit routes of the brain for cells and antigens are now well established (Weller et al., 2010; Laman and Weller, 2012). According to reports in the literature, it seems that due to an efficient drainage of both cerebrospinal fluid and interstitial fluid from the CNS, antigen presenting cells (APCs) and antigens existing in the brain tissue would reach regional lymphoid organs (Laman and Weller, 2012). It was found, for example, that in healthy animals, dendritic cells injected into the CSF, migrate to cervical lymph nodes and may also build the connection to the humoral response, since these cells preferably migrate to B-cell regions in the lymphoid tissue (Hatterer et al. 2006). Thus, in the present mouse model, we speculate that a possible escape of APCs through specific exit routes present in the CNS would represent an important link between the i.c.-infection and the systemic effects observed. Yet, more investigation is still necessary in order to ensure the participation of these mechanisms in this model.

## **Conclusions**

In this work, we found that immunocompetent BALB/c mice inoculated by the i.c. route with a neuroadapted DENV strain can display peripheral effects such as cellular and humoral responses. These effects include: T cell activation and migration to affected organs, antibody production against virus proteins, and pro-inflammatory cytokine production. Besides lethality, these parameters may represent new endpoints to evaluate anti-dengue vaccines and/or antiviral substances.

## **Acknowledgments**

We thank Dr. Luis Carlos S. Ferreira (Laboratory of Vaccine Development, Department of Microbiology, USP Brazil), for kindly supplying the recombinant NS1 protein used in ELISA assays and Heloisa Diniz (Service of Image Production and Processing, IOC, Fiocruz, Brazil) for the technical assistance with the figures. Financial support: CNPq, FAPERJ, INCTV and PDTIS-FIOCRUZ.

## Materials and methods

### *Mice infection*

The mouse-brain adapted dengue 2 virus (DENV2), strain New Guinea C (NGC) (GenBank M29095), was used for animal infections. DENV2 NGC strain propagation was carried out in Vero cells cultured in medium 199 with Earle salts (E199) buffered with sodium bicarbonate (Sigma, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, USA). Supernatants obtained from cell cultures without virus were used for mock inoculations.

Experiments with mice were conducted in compliance with ethical principles in animal experimentation stated in the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Institute's Animal Use Ethical Committee (approval ID: L067/08 and LW14/12).

Male BALB/c mice, specific pathogen free (SPF), 4 to 6 weeks old, were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine (Erhardt et al., 1984) and intracerebrally inoculated with 30  $\mu$ L of DENV2 NGC 40 LD<sub>50</sub>, diluted in E199 medium. For recording mortality rates, groups of animals were followed up for 21 days post infection and after that period they were sacrificed. Morbidity signs were count as the appearance of hind leg paralysis and alterations in spinal column. Infected or control animals were also sacrificed at different time points for kinetic studies, and blood, obtained from cardiac puncture, spleens, livers and brains were collected for further analysis.

### *Virus detection*

Brain, liver and serum samples were obtained from animals inoculated with DENV2, or the mock negative control, at days 1, 3, 5, 7, and 9-11 after infection and stored in liquid nitrogen. DENV2 detection was performed in Vero cell monolayers grown in 24-well plates with medium E199, 1% garamycin, buffered with 5% sodium bicarbonate, supplemented with 5% FBS, and maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. In the next day, brain or liver samples, macerated in E199 medium, as well as serum, were serially diluted (from 10<sup>1</sup> to 10<sup>6</sup>) and added to cell monolayers, followed by incubation for 1h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Culture medium was then removed and cells were maintained for 6 days with 1ml of semi-solid E199 medium (with 3% carboxymethylcellulose, 1% garamycin, buffered with 5% sodium bicarbonate, supplemented with 5% FBS) also at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After this period, cells were fixed with 10% formalin, stained with crystal violet and plaques were manually counted. When detection of DENV2 was in high magnitude, viral titers were calculated and expressed as the sample dilution which lead to the presence of 50% of plaque forming units (PFU) / mL and values were plotted as log<sub>10</sub>.

### *Flow cytometry*

For flow cytometry analysis, leukocytes were isolated from blood, spleen, brain and liver. All organs were dissociated in wire mesh screens using RPMI medium. Spleen macerates and blood samples were treated with BD FACS Lysing for red blood cell lysis and fixation according to manufacturer's instructions (BD Biosciences, USA). Brain infiltrated leukocytes were isolated by Percoll and Ficoll gradients. For the Percoll gradient, 5 mL of brain macerates were added to a tube containing 10 mL of RPMI, 9 mL of Percoll and 1 mL of PBS 10x. Samples were centrifuged at 7800 g for 30 min at room temperature. Leucocyte rings obtained after separation were washed and suspended in 5 mL of RPMI. Isolates were then gently transferred to tubes containing 5 mL of Ficoll. Samples were spinned down at 800 g for 30 min at room temperature. Mononuclear cell ring and interphase were isolated, washed two times and suspended in PBS pH 7.4. Samples were then treated with BD FACS Lysing solution. Leukocyte purification from liver macerates was carried out using only the Ficoll density gradient followed by treatment with BD FACS Lysing, as described above.

Isolated cells were finally washed and suspended in PBS/BSA 1%. Approximately  $10^6$  cells were stained on ice for 20 min in the dark with the following mab combinations: (i) B220-APC, IgD-FITC and CD4-PE; (ii) CD3-PE, CD4-Alexa Fluor 647, CD8-PercP and CD45RB-FITC or (iii) CD4-Alexa Fluor 647, CD8-PercP, CD45RB-FITC, CD44-PE and CD62L-PECy7. All mabs used for this work were obtained from BD Biosciences and background-staining controls were performed using isotypes recommended by the manufacturer. Samples were read in a BD FACS Canto II and analyzed offline with FlowJo (Three StarInc, USA) software.

#### *Histological analysis*

Brain and liver tissue samples from BALB/c mice inoculated with DENV2 NGC or mock were fragmented, fixed in formalin (10%) and blocked in paraffin resin. Sections were cut with 4  $\mu$ m thick, deparaffinized in xylene and rehydrated with alcohol, as previously described (Paes et al., 2009). Tissue sections were then stained with hematoxylin and eosin for histological examination and visualized under a Nikon ECLIPSE E600 microscope.

#### *Hepatic enzyme quantification*

BALB/c mice were bled on days 0, 1, 3, 5, 7 and 9-11 after virus inoculation and serum samples were stored at -70 °C until use. Levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured (U/L) by the biochemical analyzer Reflotron® Plus (Roche, Switzerland) as determined by the manufacturer.

#### *Detection of anti-NS1 antibody response*

Plasma samples were tested individually for the presence of NS1-specific antibodies by ELISA. Briefly, MaxiSorp plates (Nunc, Denmark) were coated with 0.4  $\mu$ g / well of refolded recombinant NS1 protein (Amorim et al., 2010) in PBS, and incubated for 1 h at 37 °C. After this period, wells were overnight-blocked with 2 % skim milk in 0.05 % Tween-20-PBS (PBST). In the next day, serum samples were serially diluted and added to plates previously washed 5 times with PBST. After 1 h at 37 °C, plates were washed again with PBST and incubated with goat anti-mouse IgG or IgM, both conjugated with horseradish peroxidase (Southern Biotechnology, USA) for 1 h at 37 °C. Plates were washed in PBST and incubated with ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma, USA) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 min at room temperature. Reaction was stopped with 9 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution and visualized at A 490 nm. Titers were established as the reciprocal of serum dilution that gave absorbance higher than mean values of respective non-infected mouse samples.

#### *Cytokine quantification*

Cytokines were measured with BD CBA Mouse inflammation kit (BD Bioscience) using plasma of infected animals. In this analysis, interleukin-12p70 (IL-12p70), interleukin-6 (IL-6), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-10 (IL-10) and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) were simultaneously detected in each sample. Detection was performed according to the manufacturer's instruction with modifications. Briefly, beads coated with six specific capture antibodies were pooled. Subsequently, 25  $\mu$ L of the mixed captured beads, 25  $\mu$ L of the tested plasma sample or the provided standard cytokines and 25  $\mu$ L of PE-detection reagent were added consecutively to each assay tube, incubated for 2 h at room temperature in the dark. Samples were washed and centrifuged at 200 g for 5 min. Supernatants were discharged and the bead pellets were suspended in 300  $\mu$ L of a buffer provided by the manufacturer. Samples were read on a BD FACS Canto II Flow Cytometer and analyzed by FCAP Array™ Software (BD

Bioscience). Cytokine standards were serially diluted for the construction of calibration curves to assess cytokine concentrations in tested samples. The theoretical limits of detection were 10.7 pg/mL for IL-12p70, 5.0 pg/mL for IL-6, 2.5 pg/mL for IFN- $\gamma$ , 7.3 pg/mL for TNF, 17.5 pg/mL for IL-10 and 52.7 pg/mL for MCP-1.

#### *Statistical analysis*

Data were analyzed with GraphPad prism software v 5.1 (La Jolla, USA) using non-parametric tests. Mann-Whitney test was applied for comparisons in ELISA or flow cytometry tests. Kaplan-Meyer survival distributions were evaluated using Log-Rank statistical test to check differences on biological treatments. Relevant differences were defined with probability (p) values inferior to 0.05.

#### **References**

- Amaral DC, Rachid MA, Vilela MC, Campos RD, Ferreira GP, Rodrigues DH, Lacerda-Queiroz N, Miranda AS, Costa VV, Campos MA, Kroon EG, Teixeira MM, Teixeira AL. Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice. *J Neuroinflammation*. 2011; 8:23. doi: 10.1186/1742-2094-8-23.
- Amorim JH, Porchia BF, Balan A, Cavalcante RC, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, de Souza Ferreira LC. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods*. 2010; 167(2): 186-92. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.04.003.
- Araújo FM, Araújo MS, Nogueira RM, Brilhante RS, Oliveira DN, Rocha MF, Cordeiro RA, Araújo RM, Sidrim JJ. Central nervous system involvement in dengue: a study in fatal cases from a dengue endemic area. *Neurology*. 2012; 78(10): 736-42. doi: 10.1212/WNL.0b013e31824b94e9.
- Arima Y, Harada M, Kamimura D, Park JH, Kawano F, Yull FE, Kawamoto T, Iwakura Y, Betz UA, Márquez G, Blackwell TS, Ohira Y, Hirano T, Murakami M. Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell*. 2012; 148: 447-457. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.022
- Azevedo AS, Yamamura AM, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M, Galler R, Alves AM. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. *PLoS One*. 2011; 6(7): e20528. doi: 10.1371/journal.pone.0020528.
- Basílio-de-Oliveira CA, Aguiar GR, Baldanza MS, Barth OM, Eyer-Silva WA, et al. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro. *J Infect Dis*. 2005; 9: 341-347.
- Bhamarapravati N, Tuchinda P, Boonyapaknavik V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol*. 1967; 61(4): 500-10.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446): 504-7. doi: 10.1038/nature12060.
- Bordignon J, Probst CM, Mosimann AL, Pavoni DP, Stella V, Buck GA, Satproedprai N, Fawcett P, Zanata SM, de Noronha L, Krieger MA, Duarte Dos Santos CN. Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. *Virology*. 2008; 377(2): 319-29. doi: 10.1016/j.virol.2008.04.033.
- Burke T. Dengue haemorrhagic fever: a pathological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1978; 62: 682-692.
- Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, Gascón J. Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol*. 2013; 12(9): 906-19. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70150-9.
- Chimelli L, Hahn MD, Netto MB, Ramos RG, Dias M, Gray F. Dengue: neuropathological findings in 5 fatal cases from Brazil. *Clin Neuropathol*. 1990; 9(3): 157-62.

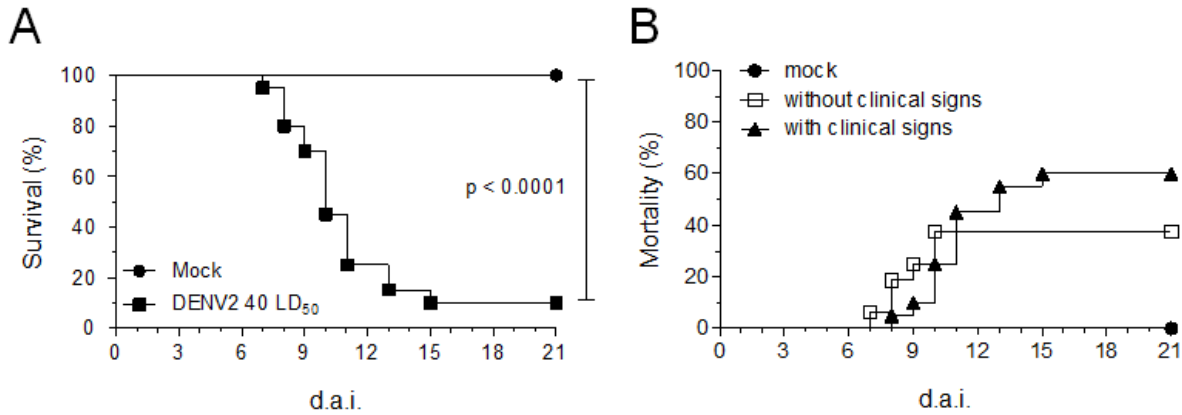
- Chuansumrit A, Chaiyaratana W2. Hemostatic derangement in dengue hemorrhagic fever. *Thromb Res*. 2014; 133(1): 10-6. doi: 10.1016/j.thromres.2013.09.028.
- Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G, Harada KE, Putnak JR, Ivy JM, McDonnell M, Bignami GS, Peters ID, Leung J, Weeks-Levy C, Nakano ET, Humphreys T. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine*. 2010; 28(15): 2705-15. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.01.022.
- Costa SM, Yorio AP, Gonçalves AJ, Vidale MM, Costa EC, Mohana-Borges R, Motta MA, Freire MS, Alves AM. Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS One*. 2011; 6(10): e25685. doi: 10.1371/journal.pone.0025685.
- Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, et al. Report a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Human Pathology*. 1999; 30: 1106–110.
- de Souza KP1, Silva EG, de Oliveira Rocha ES, Figueiredo LB, de Almeida-Leite CM, Arantes RM, de Assis Silva Gomes J, Ferreira GP, de Oliveira JG, Kroon EG, Campos MA. Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement. *Viol J*. 2013; 10: 267. doi: 10.1186/1743-422X-10-267.
- Domingues RB, Kuster GW. Diagnosis and Management Neurologic Manifestations Associated with Acute Dengue Virus Infection. *Journal of Neuroinfectious Diseases* 2014; 5(1):1-5. doi: 10.4172/2314-7326.1000138.
- Engelhardt B, Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS*. 2011; 8(1): 4. doi: 10.1186/2045-8118-8-4.
- Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blümel G. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). *Res Exp Med (Berl)*. 1984; 184(3):159-69.
- Franca RF, Zucoloto S, da Fonseca BA. A BALB/c mouse model shows that liver involvement in dengue disease is immune-mediated. *Exp Mol Pathol*. 2010;89(3):321-6. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.07.007
- Gubler DJ. The economic burden of dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 86(5): 743-4. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0157.
- Hatterer E, Davoust N, Didier-Bazes M, Vuillat C, Malcus C, Belin MF, Nataf S. How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood*. 2006; 107:806-812
- Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch*. 2001; 438: 107–115.
- Huy NT, Van Giang T, Thuy DH, Kikuchi M, Hien TT, Zamora J, Hirayama K. Factors Associated with Dengue Shock Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(9): e2412. doi: 10.1371/journal.pntd.0002412.
- Kamimura D, Yamada M, Harada M, Sabharwal L, Meng J, Bando H, Ogura H, Atsumi T, Arima Y, Murakami M. The gateway theory: Bridging neural and immune interactions in the CNS. *Front Neurosci*. 2013; 7: 204. doi: 10.3389/fnins.2013.00204.
- Kho LK, Sumarmo, Wulur H, Jahja EC, Gubler DJ. Dengue hemorrhagic fever accompanied by encephalopathy in Jakarta. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 198; 12(1): 83-6.
- Koshy JM, Joseph DM, John M, Mani A, Malhotra N, Abraham GM, Pandian J. Spectrum of neurological manifestations in dengue virus infection in Northwest India. *Trop Doct*. 2012; 42(4): 191-4. doi: 10.1258/td.2012.120286.
- Laman JD, Weller RO. Editorial: route by which monocytes leave the brain is revealed. *J Leukoc Biol*. 2012; 92(1): 6-9. doi: 10.1189/jlb.0212110.

- Lin YL, Liao CL, Chen LK, Yeh CT, Liu CI, Ma SH, Huang YY, Huang YL, Kao CL, King CC. Study of dengue virus infection in SCID mice engrafted with human K562 cells. *J. Virol.* 1998; 72(12): 9729-9737.
- Lum LC, Lam SK, Choy YS, George R, Harun F. Dengue encephalitis: a true entity? *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 256-259.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(4):564-81. doi: 10.1128/CMR.00035-09.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22: 564-81.
- Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Marchevsky RS, Mesquita RP, Schtzamyr HG. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol.* 1997;16(4):204-8.
- Misra UK, Kalita J. Seizures in encephalitis: predictors and outcomes. *Seizure.* 2009; 18(8): 583-7. doi: 10.1016/j.seizure.2009.06.003.
- Nguyen TL, Nguyen TH, Tieu NT. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. *Res Virol.* 1997; 148(4): 273-7.
- Paes MV, Lenzi HL, Nogueira AC, Nuovo GJ, Pinhão AT, Mota EM, Basílio-de-Oliveira CA, Schatzmayr H, Barth OM, Alves AM. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest.* 2009; 89(10): 1140-51. doi: 10.1038/labinvest.2009.83.
- Paes MV, Pinhão AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, Nogueira AC, Takiya CM, Farias-Filho JC, Schatzmayr HG, Alves AM, Barth OM. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology.* 2005; 338(2): 236-46.
- Patey O, Ollivaud L, Breuil J, Lafaix C. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 793-802.
- Plummer EM, Shresta S. Mouse models for dengue vaccine and antivirals. *J Immunol Methods.* 2014; 410: 34-8. doi: 10.1016/j.jim.2014.01.001.
- Porter KR, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I, Hayes CG. Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol.* 1998; 143(5): 997-1003.
- Póvoa TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One.* 2014; 9(4): e83386. doi: 10.1371/journal.pone.0083386.
- Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(8):532-43. doi: 10.1038/nri3014.
- Row D, Weinstein P, Murray-Smith S. Dengue fever with encephalopathy in Australia. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54(3): 253-5.
- Sabin AB, Schlesinger RW. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science.* 1945; 101(2634): 640-2.
- Sarathy VV, White M, Li L, Gorder SR, Pyles RB, Campbell GA, Milligan GN, Bourne N, Barrett AD. A lethal murine infection model for dengue virus 3 in AG129 mice deficient in type I and II interferon receptors leads to systemic disease. *J Virol.* 2015; 89(2): 1254-66. doi: 10.1128/JVI.01320-14.
- Shresta S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology.* 2004; 319(2): 262-73.
- Soares C, Puccioni-Sohler M. Diagnosis criteria of dengue encephalitis. *Arq Neuropsiquiatr* 2013; 72(3): 263.
- Souza LJ, Alves JG, Nogueira RM, Gicovate Neto C, Bastos DA, Siqueira EW, Souto Filho JT, Cezário Tde A, Soares CE, Carneiro Rda C. Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients with dengue fever: analysis of 1,585 cases. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8(2): 156-63.
- Sumarmo WH, Jahja E, Gubler DJ, Suharyono W, Sorensen K. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. *Bull World Health Organ.* 1983; 61(4): 693-701.

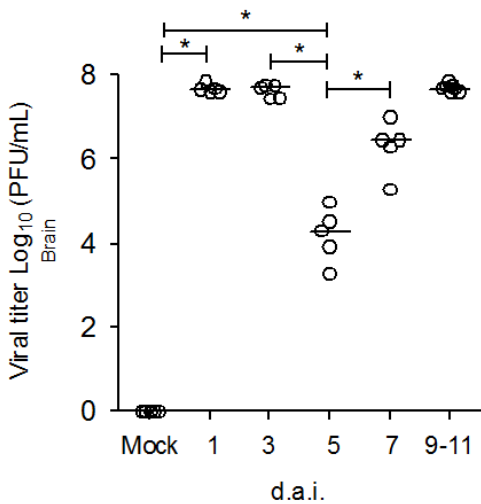
- Sumarmo WH, Jahja E, Gubler DJ, Sutomenggolo TS, Saroso JS. Encephalopathy associated with dengue infection. *Lancet*. 1978; 1(8061): 449-50.
- Sung JM, Lee CK, Wu-Hsieh BA. Intrahepatic infiltrating NK and CD8 T cells cause liver cell death in different phases of dengue virus infection. *PLoS One*. 2012; 7(9): e46292. doi: 10.1371/journal.pone.0046292.
- Valdés I, Bernardo L, Gil L, Pavón A, Lazo L, López C, Romero Y, Menendez I, Falcón V, Betancourt L, Martín J, China G, Silva R, Guzmán MG, Guillén G, Hermida L. A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2 in a highly aggregated form induces a functional immune response and protection in mice. *Virology*. 2009; 394(2): 249-58. doi: 10.1016/j.virol.2009.08.029.
- Velandia-Romero ML, Acosta-Losada O, Castellanos JE. In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. *J Neurovirol*. 2012; 18(5): 374-87. doi: 10.1007/s13365-012-0117-y.
- Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A. Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiology*. 2010; 17(4): 295-306. doi: 10.1016/j.pathophys.2009.10.007.
- World Health Organization, 2013. WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organ Tech Rep Ser 979, 1–366 back cover.
- Yauch LE, Shresta S, 2008. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res*. 2008; 80(2): 87-93. doi: 10.1016/j.antiviral.2008.06.010.
- Zellweger RM, Miller R, Eddy WE, White LJ, Johnston RE, Shresta S. Role of humoral versus cellular responses induced by a protective dengue vaccine candidate. *PLoS Pathog*. 2013; 9(10): e1003723. doi: 10.1371/journal.ppat.1003723.



Figures and Tables



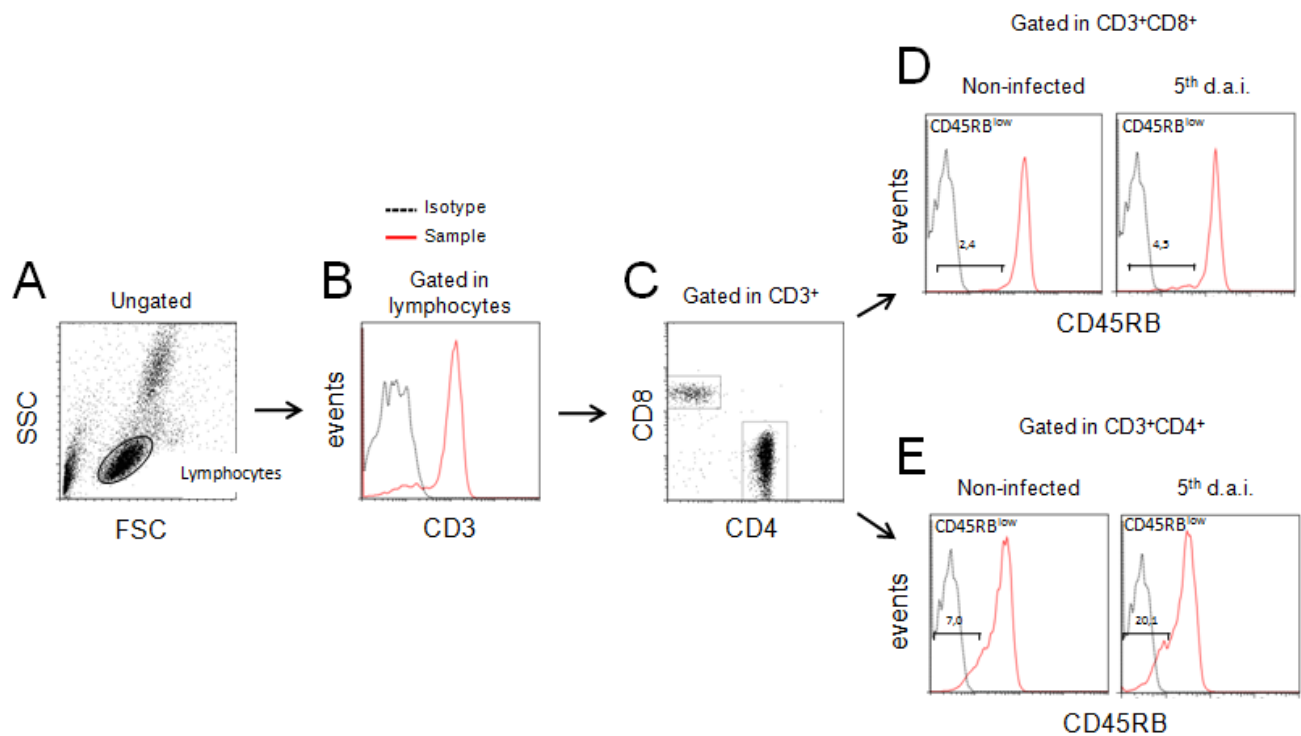
**Figure 1. Susceptibility of BALB/c mice to DENV primary infection by the i.c. route.** BALB/c mice were intracerebrally inoculated with 40 LD<sub>50</sub> of DENV2 NGC strain (DENV group) propagated in Vero cell cultures. Control group (Mock) is represented by animals injected with supernatants of non-infected Vero cell cultures. (A) Survival curves - mice were followed up for 21 days after infection. Kaplan-Meier distributions were compared using Log-Rank test using the mock group as reference. (B) Mortality rates - Curves were built considering only deaths, preceded or not by CNS dysfunction, such as spinal cord alterations (hunch back posture) or paralysis observed at least 16 h before death. Data represent a compilation of three independent experiments with groups of 6 to 7 animals in each test (n = 20). d.a.i. - days after infection.



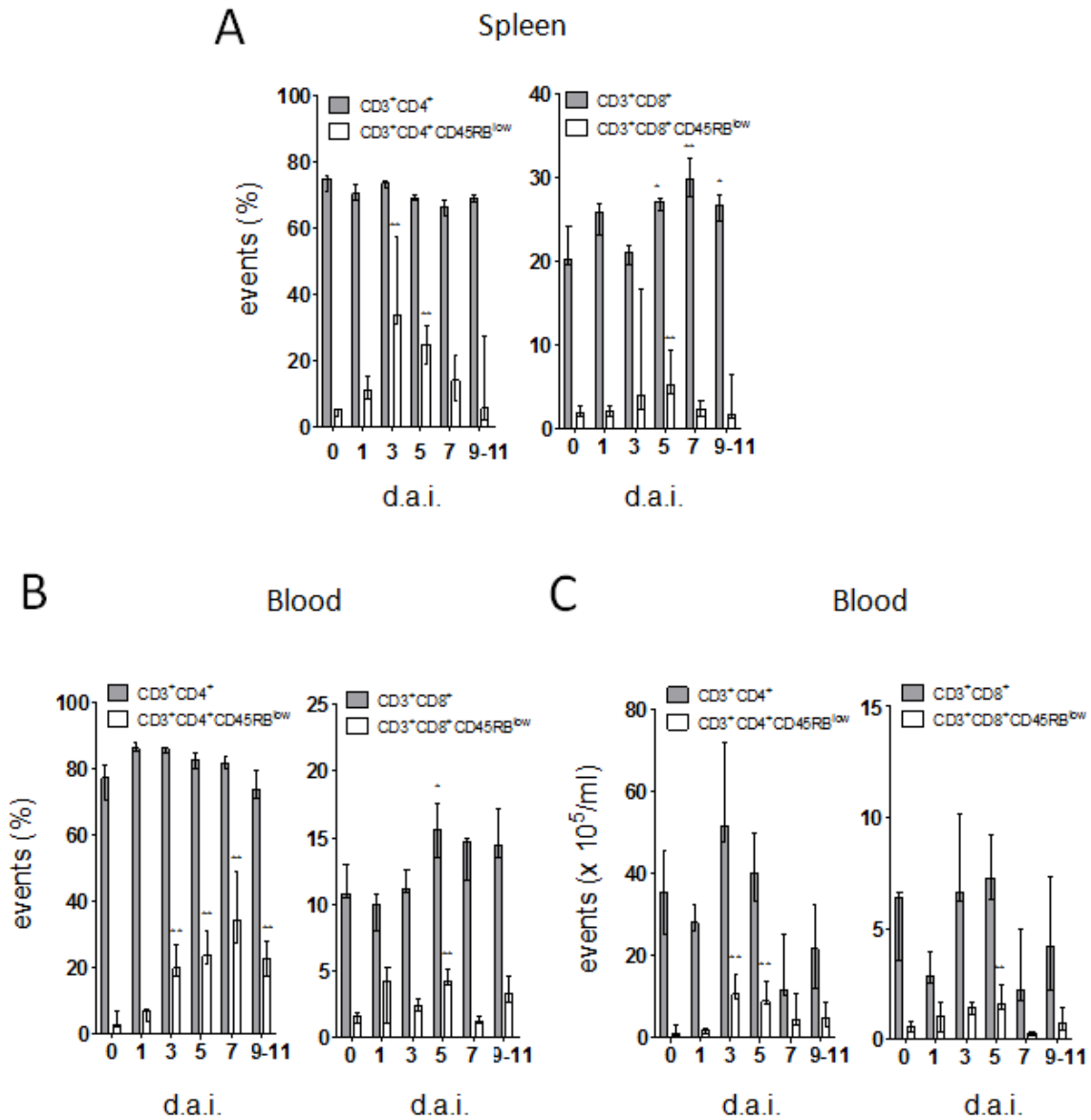
**Figure 2. Virus detection in brain samples collected from BALB/c mice infected with DENV2.** Brain samples (n = 5 to 7) extracted from mice at different days after infection were tested for the presence of infective virus particles as measured by indirect plaque assay in Vero cells. Virus titers are expressed by PFU count. Statistical differences were evaluated using Mann-Whitney test (\*p<0.05). d.a.i. - days after infection.

	d.a.i.					
	mock	1	3	5	7	9 - 10
Number of animals	0(5)	1(5)	2(5)	3(5)	2(5)	5(7)

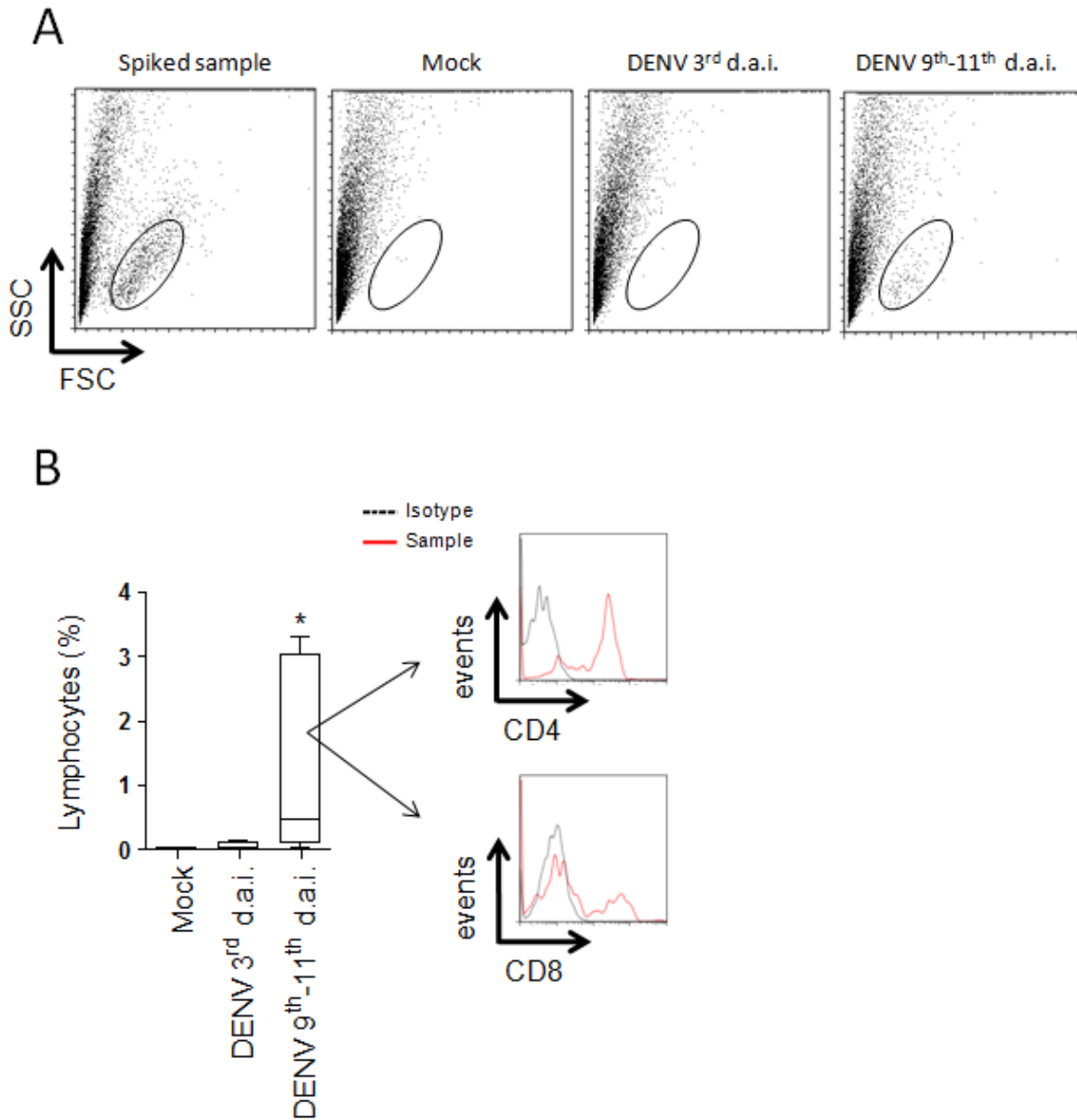
**Table 1.** Detection of virus in serum samples by qualitative analysis as evidenced by indirect plaque assay in Vero cells. Values represent the number of positive animals out of a total number of mice (between parentheses). d.a.i. - days after infection.



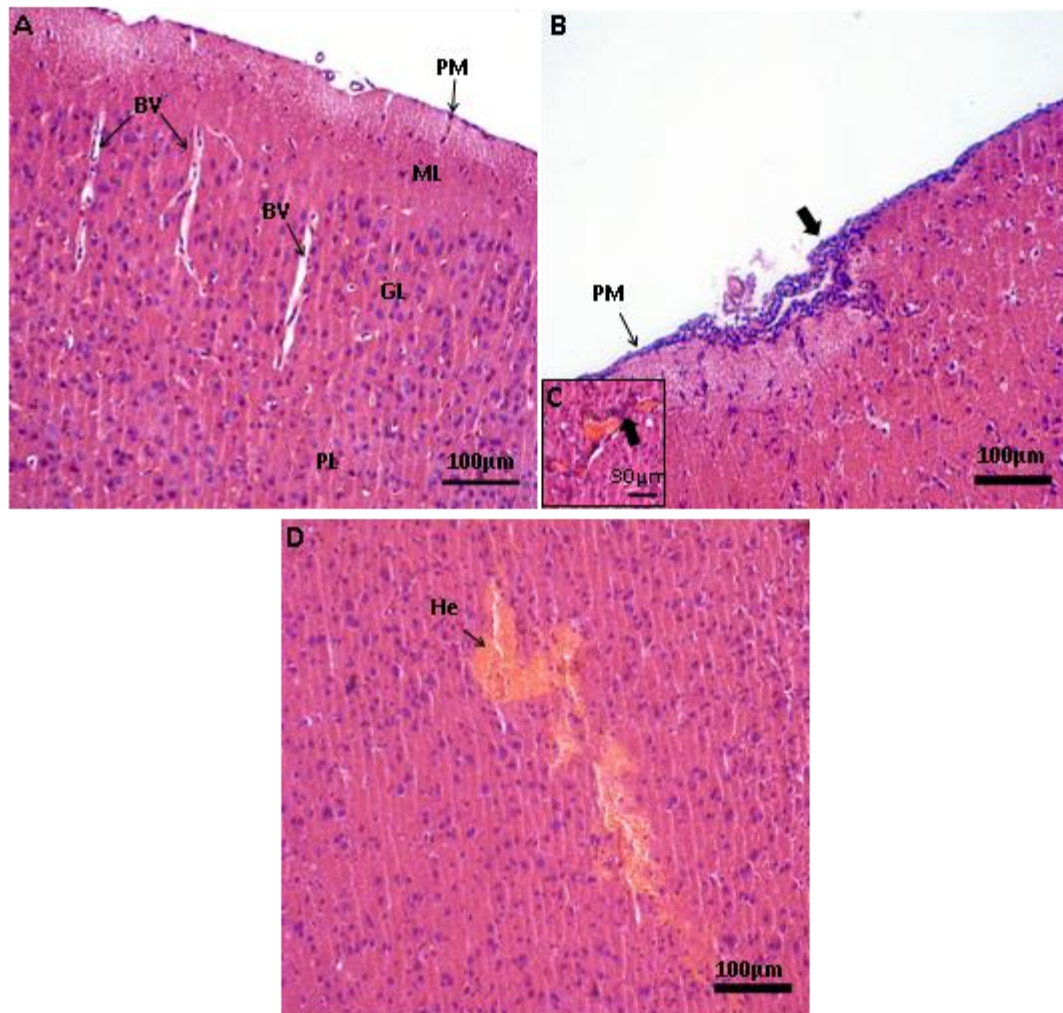
**Figure 3. Gate strategy for analysis of T cell activation in blood and spleen samples.** (A) Ungated FSC x SSC flow cytometry dot plot exhibiting a region considered as the lymphocyte region. (B and C) Histograms showing the expression of CD4 and CD8 considered in the CD3<sup>+</sup> lymphocytes. (D and E) Histograms of representative blood samples (non-infected or 5 d.a.i.) exhibiting CD45RB<sup>low</sup> events (considered as activated T cells) measured in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> counts. Values indicate percentages of cells. d.a.i. - days after infection.



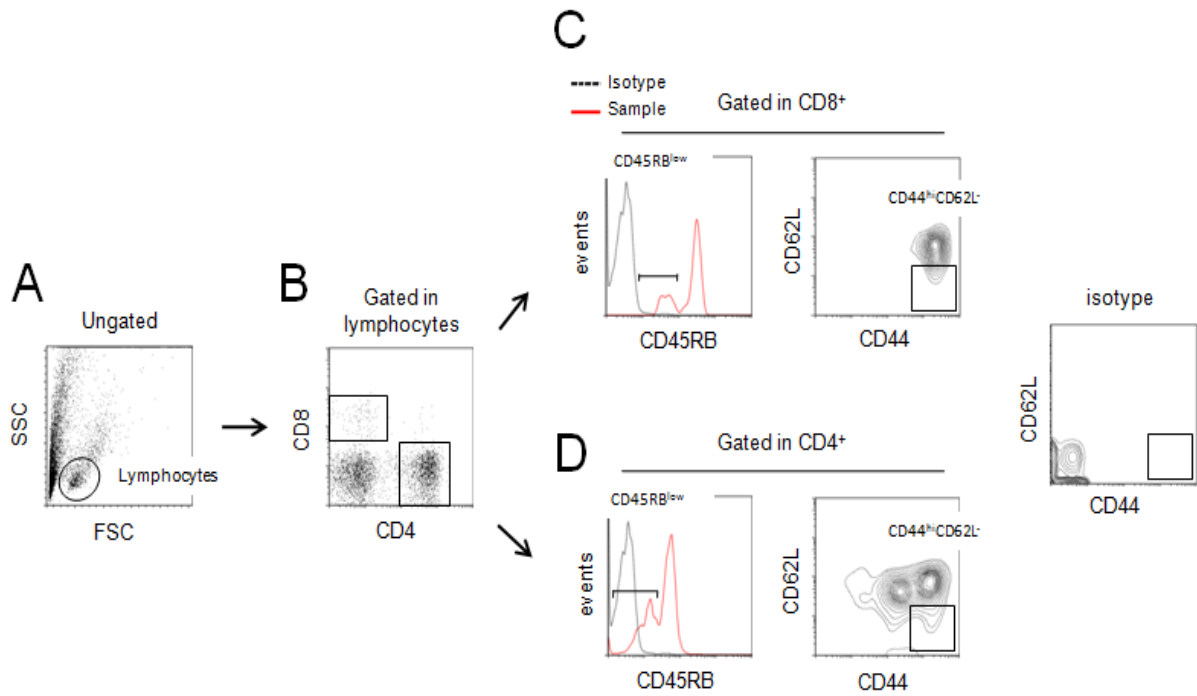
**Figure 4. T cell activation in spleen and blood of DENV-infected mice.** The activation of T cells in mice infected with the mouse-brain adapted virus was studied based on the modulation of the expression of CD45RB on the surface of these lymphocytes. (A) Spleen and (B) blood samples were collected from BALB/c mice in different time points after infection with DENV2 and analyzed by flow cytometry. Activated cells (CD45RB<sup>low</sup>) were measured in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> or in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> events, all gated in lymphocyte conventional region. Values represent percentages with median and interquartile range. (C) Absolute counts of T cells and activated subpopulations present in blood samples. Statistical differences between non-infected and infected groups were evaluated using Mann-Whitney test (\*p<0.05; \*\*p<0.01). Data represent a compilation of three independent experiments with groups of 5 animals in each test (total n = 15). d.a.i. - days after infection.



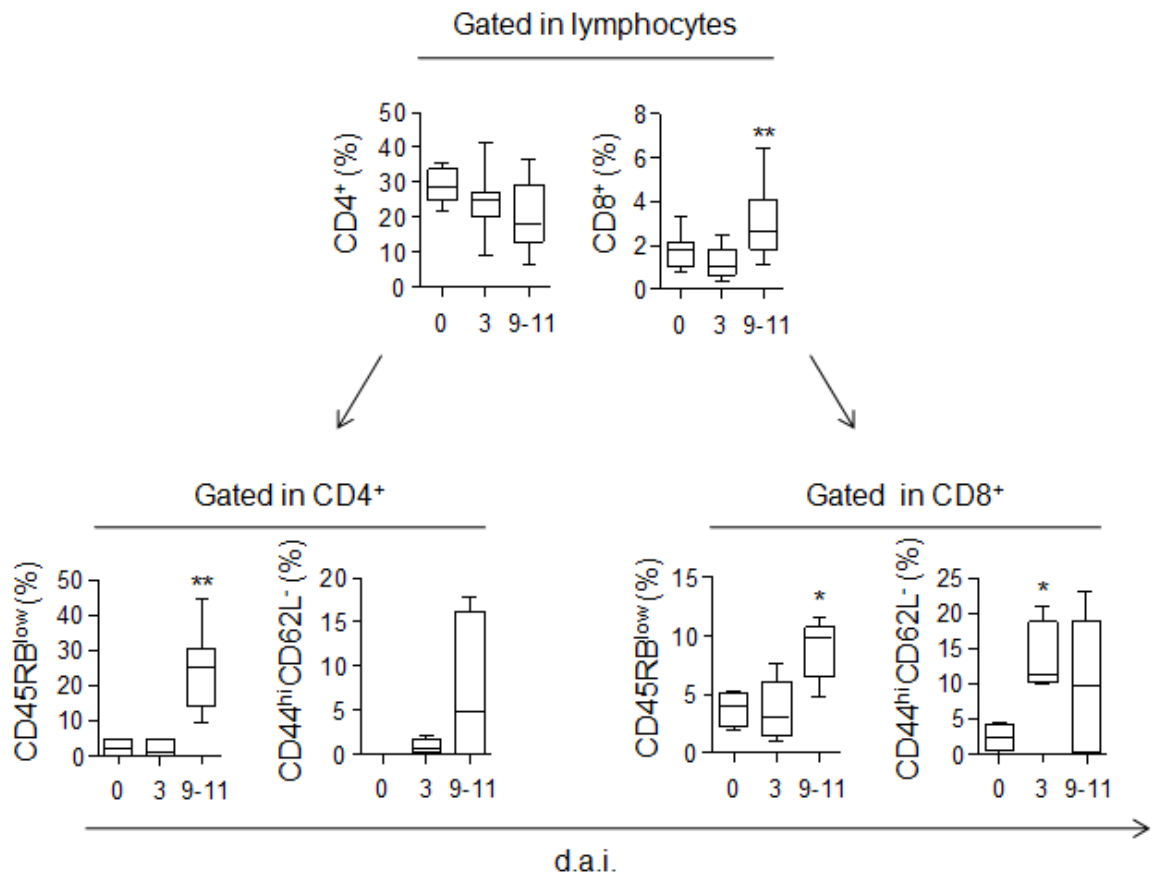
**Figure 5. Lymphocyte infiltrates into the brain of infected mice.** (A) Original flow cytometry dot plots showing forward and side scatter of cells isolated from the brain of animals on days 3 and 9-11 after infection. An additional control consisted of a brain of non-infected mice, which was processed in the presence of a small portion of splenocytes obtained from the same animal (spiked sample), was performed in order to set the lymphocyte region for further analysis. (B) Percentages of lymphocytes present in samples of mock and 3<sup>rd</sup> or 9<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> days after infection. Histograms show the presence of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the brain infiltrates. Statistical differences between mock and infected groups were evaluated using Mann-Whitney test (\*p<0.05). Data represent a compilation of two independent experiments with groups of 5 animals in each test (total n = 10). d.a.i. - days after infection.



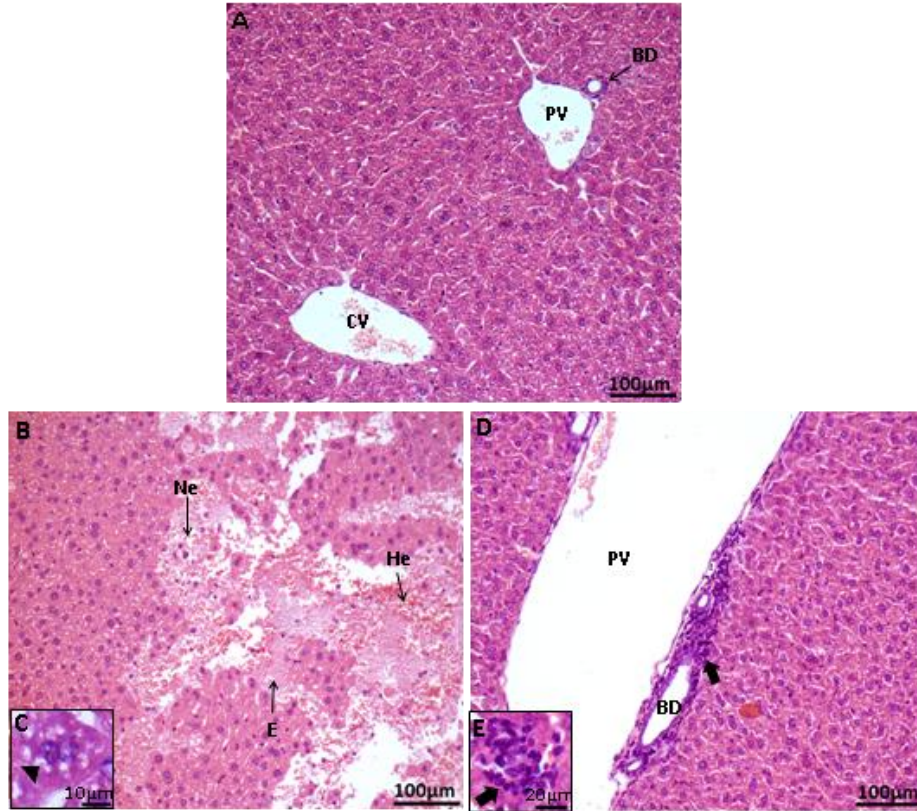
**Figure 6. Histopathological aspects of the brain tissue in BALB/c mice infected with DENV2 or mock inoculated by the intracerebral route.** (A) A representative mouse inoculated with mock, revealing normal aspect of the cerebral cortex. (B-D) Animals infected with DENV2 showing mononuclear cell infiltrates (large black arrows) in pia mater (B, C), molecular layer commitment with perivascular leukocyte cell migration inside interstitial temporal cortex (B), and hemorrhage in the cerebral parenchyma (D), observed 10 days post infection. BV - Blood vessels; He - hemorrhage; PM - pia mater; ML - molecular layer, GL- granular layer, PL – piramidal layer. Tissue sections were stained with hematoxylin / eosin and visualized by optical microscopy.



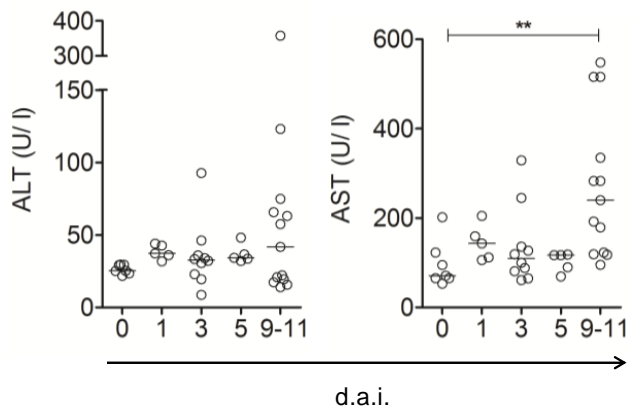
**Figure 7. Gate strategy for analysis of T cell activation in liver samples.** Lymphocytes were isolated from liver by density gradient and analyzed by flow cytometry to investigate the presence of activated/effector T cells. (A) Ungated FSC x SSC flow cytometry dot plot exhibiting a region considered as the lymphocyte region. (B) Cytometric dot plot showing the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells measured in the lymphocyte region. (C and D) Histograms and contour representations containing the considered regions of activated (CD45RB<sup>low</sup>) or effector (CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup>) T cells measured in CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> counts isolated from an infected animal 10 days after infection.



**Figure 8. Effector T cell response in the liver of infected mice.** Effector T cell response was evaluated in the liver of BALB/c mice (n = 5 per group) inoculated with DENV2 by the i.c. route in different days after infection. Flow cytometry analysis of samples isolated from the hepatic tissue, regarding T cell populations measured in the lymphocyte region (top: CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>), and activated / effector T cell subpopulations measured in CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> events (bottom: CD45RB<sup>low</sup> and CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup>). Statistical differences between non-infected and infected groups were evaluated using Mann-Whitney test (\*p<0.05; \*\*p<0.01). Data represent a compilation of three independent experiments with groups of 5 animals in each test (total n = 15). d.a.i. - days after infection.

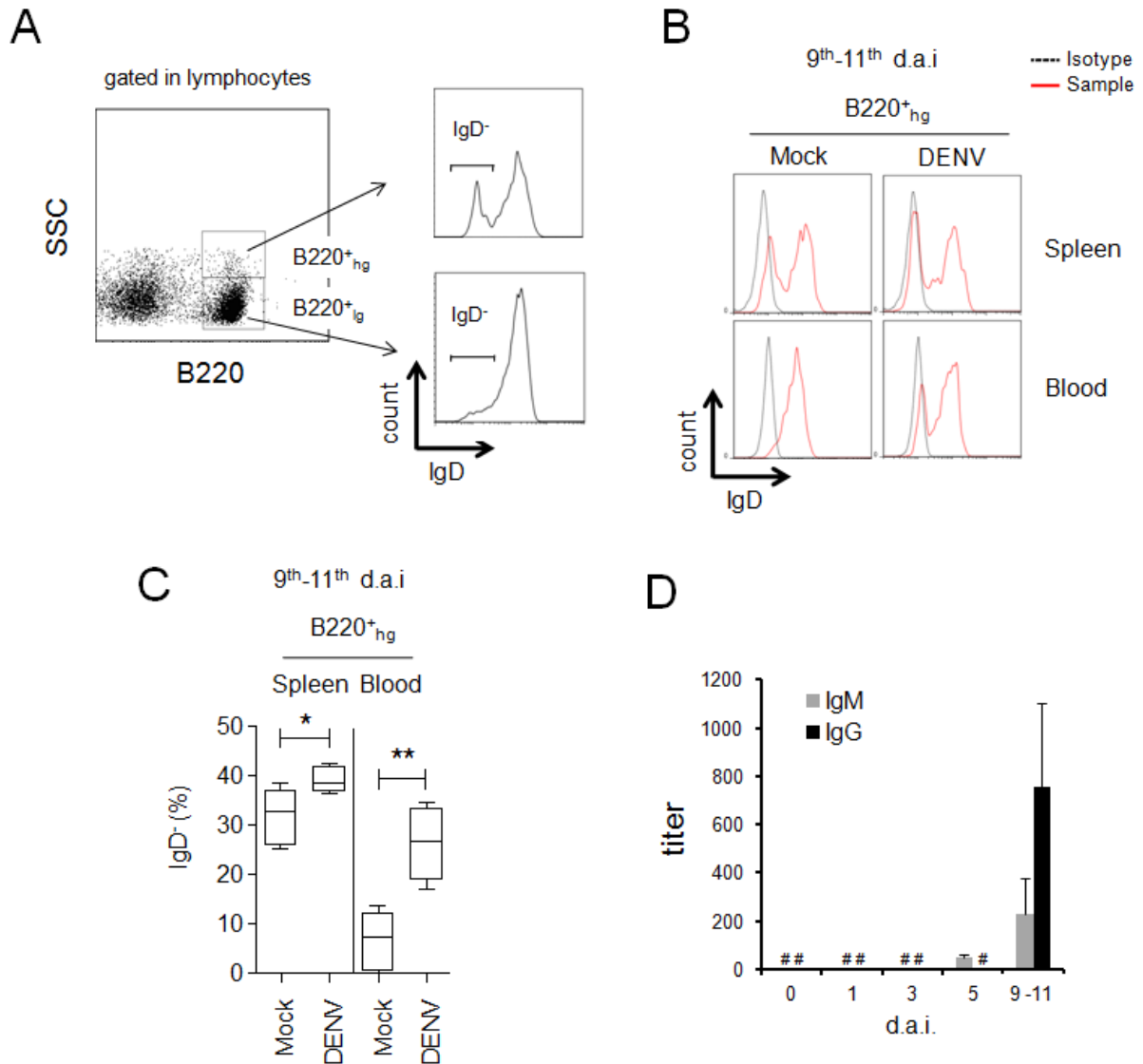


**Figure 9. Histopathological aspects of the liver tissue in BALB/c mice infected with DENV2 or mock inoculated by the intracerebral route.** (A) A representative mouse inoculated with mock, revealing normal aspect of the hepatic parenchyma. (B-C) Animals infected with DENV2 exhibiting tissue damages, mainly edema, hemorrhage (B) as well a necrosis and microsteatose (C) were already observed in the beginning of infection, in the 1<sup>st</sup> and 5<sup>th</sup> d.a.i., respectively. Mononuclear infiltrates around the port space (D) and distributed in the liver parenchyma (E), were observed 10 days post infection. CV - central vein; PV - portal vein; BD- biliar duct; E - edema; He - hemorrhage; Ne – necrosis; arrowhead indicate microsteatose; large black arrows indicate infiltrates. The tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and visualized by optical microscopy.

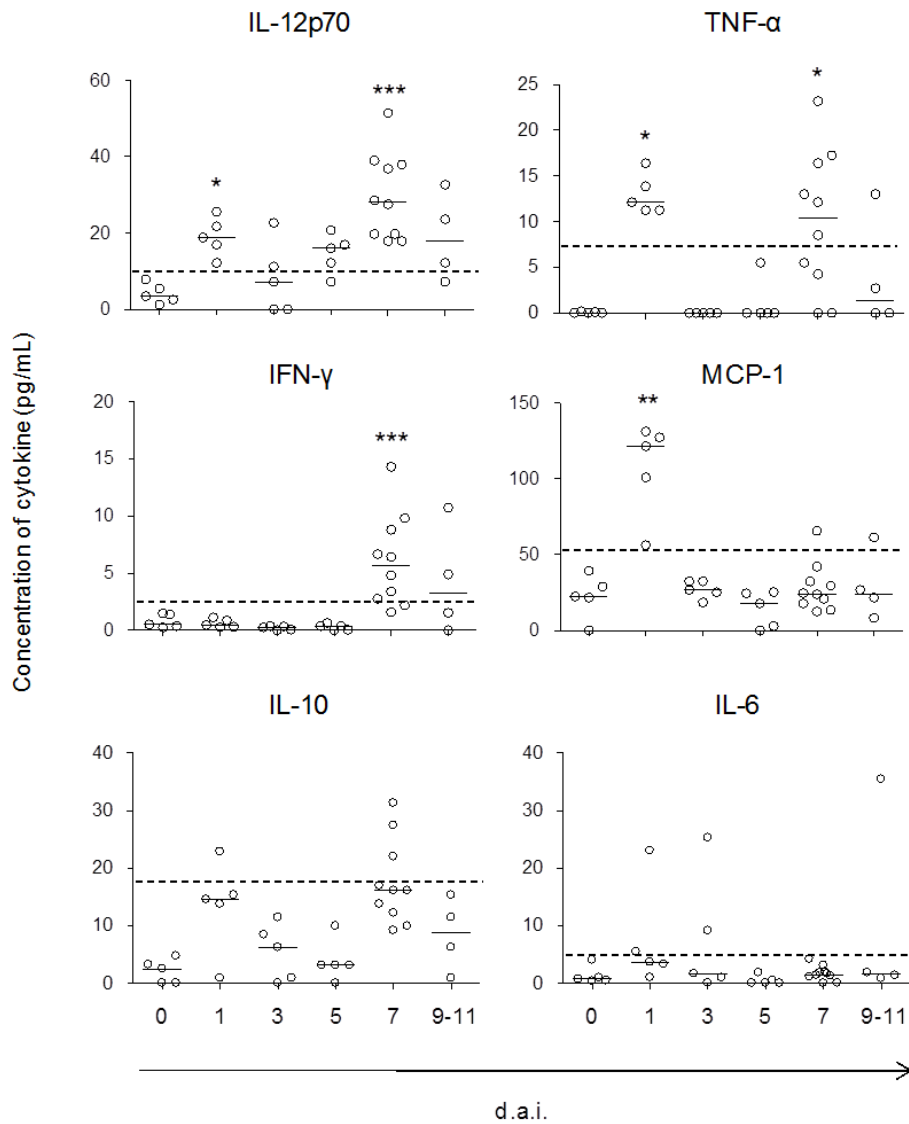


**Figure 10: Serum levels of liver enzymes in infected mice.** The enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were quantified by dry biochemistry, at different days after infection (n ranging from 5 to 13). Statistical differences between non-infected and infected groups were evaluated using Mann-Whitney test (\*\*p<0.01). d.a.i. - days after infection.





**Figure 11. Humoral immune response in infected BALB/c mice.** B cell response was evaluated in BALB/c mice intracerebrally inoculated with DENV2 in the period of 9-11 days after infection. **(A)** Flow cytometry strategy representing B220<sup>+</sup> cells analyzed in the lymphocyte region of an infected mouse blood sample. The B220<sup>+</sup> lymphocytes were divided in events of high (hg) or low (lg) granularity and the expression of IgD was measured in the cell surface. **(B)** Cytometric histograms showing the expression profile of IgD and **(C)** the quantitative analysis of IgD<sup>-</sup> cells gated in B220<sup>+</sup><sub>hg</sub> events present in spleen or blood samples of mice. Values represent percentages and statistical differences between non-infected and infected groups were evaluated using Mann-Whitney test (\*p<0.05; \*\*p<0.01). **(D)** Titer of anti-NS1 IgM and IgG measured by ELISA in plasma of mice at different days after infection. Values are expressed as mean and standard deviation. Data represent a compilation of two independent experiments with groups of 5 animals in each test (total n = 10). d.a.i. - days after infection. #undetectable value.



**Figure 12. Plasma levels of proinflammatory cytokines of infected mice.** Plasma samples of BALB/c mice inoculated with DENV2 by the intracerebral route (n ranging from 4 to 10) were collected in different days post-infection and quantified for IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-10 and IL-6, using cytometric bead array technique. Values are plotted individually with median for each group. Statistical differences between non-infected and infected groups were evaluated using Mann-Whitney test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ). Dotted line represents the limit of detection for each cytokine defined by the manufacturer. d.a.i. - days after infection.

## 9.2. Apêndice 2:

### **Cooperation between CD4<sup>+</sup> T cells and humoral immunity is critical for protection against dengue using a DNA vaccine based on the NS1 antigen**

Antônio J. S. Gonçalves<sup>1</sup>, Edson R. A. Oliveira<sup>1</sup>, Simone M. Costa<sup>1</sup>, Marciano V Paes<sup>1</sup>, Juliana F. A. Silva<sup>1</sup>, Adriana S. Azevedo<sup>1</sup>, Márcio Mantuano-Barradas<sup>1</sup>, Ana Cristina M. A. Nogueira<sup>1</sup>, Cecília J. Almeida<sup>2</sup>, Ada M. B. Alves<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biotechnology and Physiology of Viral Infections, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Immunopharmacology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

\*Correspondence: Dr. Ada M. B. Alves, Avenida Brasil 4365, Pav. Leônidas Deane, s.200, Rio de Janeiro, Brazil, CEP:21040-360.

E-mail: ada@ioc.fiocruz.br

#### **Abstract**

Dengue virus (DENV) is spread through most tropical and subtropical areas of the world and represents a serious public health problem. At present, the control of dengue disease is mainly hampered by the absence of antivirals or a vaccine, which results in an estimated half worldwide population at risk of infection. The immune response against DENV is not yet fully understood and a better knowledge of it is now recognized as one of the main challenge for vaccine development. In previous studies, we reported that a DNA vaccine containing the signal peptide sequence from the human tissue plasminogen activator (t-PA) fused to the DENV2 NS1 gene (pcTPANS1) induced protection against dengue in mice. In the present work, we aimed to elucidate the contribution of cellular and humoral responses elicited by this vaccine candidate for protective immunity. We observed that pcTPANS1 exerts a robust protection against dengue, inducing considerable levels of anti-NS1 antibodies and T cell responses. Passive immunization with anti-NS1 antibodies conferred partial protection in mice infected with low virus load (4 LD<sub>50</sub>), which was abrogated with the increase of viral dose (40 LD<sub>50</sub>). The pcTPANS1 also induced activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. We detected production of IFN- $\gamma$  and cytotoxicity activity by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes induced by this vaccine, but its contribution in the protection was less important when compared to CD4<sup>+</sup> cells. Depletion of CD4<sup>+</sup> cells in immunized mice completely abolished protection. Furthermore, transfer experiments revealed that animals receiving CD4<sup>+</sup> T cells combined with anti-NS1 antiserum, both obtained from vaccinated mice, survived virus infection with survival rates not significantly different from pcTPANS1-immunized animals. Taken together, results showed that the protective immune response induced by the expression of NS1 antigen mediated by the pcTPANS1 requires cooperation mainly between CD4<sup>+</sup> T cells and the humoral immunity.

## Author Summary

Dengue is an emerging mosquito-borne disease present in an extensive area of the globe with an estimated exposure of half world population at risk of infection. Unfortunately, no specific treatment or vaccine is available to control this disease, which leads to approximately 20,000 casualties annually. The protective immune response against this pathogen consists of an important goal for the development of anti-dengue strategies. For years, the presence of neutralizing antibodies was believed to represent the major response for protection against dengue. However, a recent clinical trial showed that despite the induction of a balanced antibody response against all serotypes, vaccination had only a partial efficacy. In the present work, we aimed to elucidate the contribution of the cellular and humoral responses elicited by a DNA vaccine candidate encoding the non-structural 1 protein (NS1) from dengue virus. We observed that antibody as well as T cell responses are important for protection against dengue in a cooperative way. Our results demonstrated that an effective defense against virus was not achieved with antibodies or T cells alone, but rather with the combination of both responses. Therefore, we suggest that an ideal vaccine against dengue should induce both arms of the immune system.

## Introduction

Dengue represents the most important human mosquito-borne disease worldwide. Each year, an estimated 96 million people are infected [1], in which 20000 die [2]. The illness is caused by dengue virus (DENV), which consists of four distinct serotypes (DENV1-4), present in tropical and subtropical regions of the globe. Infection may be asymptomatic or can be manifested as a non-differentiate febrile, marked mainly by myalgia, headache and retroorbital pain. The most severe forms of the disease are characterized by plasma leakage, thrombocytopenia and hemorrhage, which can evolve to hypovolemic shock [3-4].

The DENV genome is a single positive RNA strand of approximately 11 kb, which is translated into a single polyprotein. This polyprotein is further cleaved into three structural proteins, capsid (C), premembrane (prM), and envelope (E), and seven nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) [5].

The NS1 is a conserved N-linked glycoprotein, which is synthesized as a monomer and dimerizes after posttranslational modification in the lumen of the endoplasmic reticulum [5]. This glycoprotein is found in mammalian infected cells associated with plasma membrane and also secreted into the circulation as a soluble multimer, with reports of up to 50  $\mu\text{g/mL}$  in the sera of some dengue patients [6-11]. The NS1 is still an enigmatic protein whose mechanistic function remains somewhat unknown. Intracellular NS1 of many flavivirus co-localizes with dsRNA and other components of the viral replication complex and plays an essential role in replication [12-16]. The secreted form of NS1, in its turn, seems to be implicated in immune evasion strategies. It may inhibit, for instance, complement activation by binding to the regulatory protein factor H [17]. The NS1 is highly immunogenic, inducing significant levels of anti-NS1 antibodies in dengue infected patients [18-20]. Some reports have pointed the NS1 as a target antigen for the development of dengue vaccines [21-26], while others suggested a role for this protein rather in the pathogenesis [27-34]. Thus, it

still remains an apparent paradox due to its ability to elicit both protective and potentially pathogenic immune responses.

No currently antiviral treatment against dengue is available and the development of an effective anti-dengue vaccine would represent a cornerstone in public health. An important aspect of dengue is that an effective immunity can be potentially impaired during heterologous infections, which may lead to severe manifestations of dengue and represents a great burden in the development of a vaccine against this pathogen [35-40]. There is a consensus that a vaccine against dengue should be tetravalent, inducing a long term protective immunity. In this environment, a better understanding of the immunological mechanisms by which a protective immunity against dengue is generated, became critical for the development of a vaccine. For years, the presence of serum neutralizing antibodies was believed to represent the major component of an effective protection against the infection. Yet, a recent clinical trial showed that neutralizing antibodies alone might not constitute the only key element to confer protection. In fact, despite of a balanced antibody response against all serotypes in this phase IIb trial, vaccination resulted in partial efficacy [41].

In this context, we analyzed, herein, the protective immune response elicited by a DNA vaccine (pcTPANS1) encoding the NS1, which, as a non-structural protein, does not elicit neutralizing antibodies. We have previously reported that this DNA vaccine can be protective against DENV infection in mice [23,24]. We showed that this protection is robust, in part characterized by anti-NS1 specific antibodies and T cells responses. We found that cooperation between CD4<sup>+</sup> T cells and the humoral response plays a critical role on the protection against dengue mediated by the NS1 antigen. Our data provides new insights on the immunity elicited by DENV NS1 antigen as well as on a prospect for vaccine development.

## **Materials and methods**

### **DNA vaccine**

Immunizations were performed using a DNA vaccine, pcTPANS1, previously described [23,24]. Briefly, this plasmid, derived from pcDNA3 (Invitrogen, USA), encodes the full length NS1 gene from DENV2, strain New Guinea C, fused to the human tissue plasminogen activator signal sequence (t-PA). The pcTPA plasmid [22], without the NS1 gene, was used as control. Plasmids were isolated from transformed *Escherichia coli*, DH5- $\alpha$  strain, and purified by Qiagen Endofree Plasmid Giga Kit (Qiagen, Germany) following manufacturer's instruction. Purified plasmids were eluted in endotoxin-free sterile water and kept at -20 °C until use.

### **Ethics Statement**

The study in mice was carried out in accordance with ethical principles in animal experimentation stated in the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Oswaldo Cruz Institute's Animal Use Ethical Committee (approval ID: L067/08 and LW14/12).

## **DNA immunization**

Wild-type SPF male Balb/c mice, 4 to 6 week-old, were purchased from the Multidisciplinary Center for Biological Investigations (CEMIB, UNICAMP-SP). Animals were inoculated by the intramuscular (i.m.) route with 50 µg of plasmids diluted in 50 µL of phosphate buffer saline (PBS) in each tibialis posterior muscles (100 µg/mice) using 27-gauge needles. Each animal group received two doses of the recombinant plasmid, pcTPANS1, or control vector, pcTPA, given 2 weeks apart. Cells and/or sera were collected four weeks after the first immunization or 21 days after virus challenge.

## **Histological analysis**

Liver tissue samples from the Balb/c mice immunized with pcTPANS1 or naïve animals were fixed in formalin (10%), blocked in paraffin resin, cut in 4µm, deparaffinized in xylene and rehydrated with alcohol, as described elsewhere [42]. Sections were stained with hematoxylin and eosin for histological examination and visualized in a Nikon ECLIPSE E600 microscope.

## **Quantification of hepatic enzymes in serum samples**

Levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured (U/L) in serum samples of BALB/c mice inoculated with pcTPANS1 or pcTPA. Animals were bled 4 weeks after DNA injection and enzymes were quantified by the biochemical analyzer Reflotron® Plus (Roche, Switzerland) as determined by the manufacturer.

## **Virus challenge**

Animals were challenged by the intracerebral (i.c.) route with a mouse brain adapted DENV2, strain New Guinea C (GenBank M29095). Mice were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine [43] and inoculated with 30 µL of DENV2 suspensions, corresponding to 4 or 40 LD<sub>50</sub>, diluted in E199 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen). Animals were monitored for 21 or 40 days.

## **Detection of viremia**

Serum samples, obtained from naïve or pcTPANS1-vaccinated mice challenged with DENV2, were collected 9 days after virus infection. Virus was detected by plaque assay in Vero cell monolayers. Cells were grown in 24-well plates with medium E199, 1% garamycin, buffered with 5% sodium bicarbonate, supplemented with 5% FBS, and maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. In the next day, serum samples were added to cell monolayers, followed by incubation for 1h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Culture medium was then removed and cells were maintained for 6 days with 1ml of semi-solid E199 medium (with 3% carboxymethylcellulose, 1% garamycin, buffered with 5% sodium bicarbonate, supplemented with 5% FBS) also at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After this period, cells were fixed with 10% formalin, stained with crystal violet and plaques were

manually counted. Negative control was performed with sera from non-immunized mice.

### **Detection of anti-NS1 antibody response**

Mouse serum samples were tested (individually or pooled) for the presence of NS1-specific antibodies by ELISA. Briefly, MaxiSorp plates (Nunc, Denmark) were coated with 0.4µg / well of refolded recombinant NS1 protein [44] in PBS, and incubated for 1 h at 37°C. After this period, wells were overnight-blocked with 2% skim milk in 0.05% Tween-20-PBS (PBST). In the next day, serum samples were serially diluted and added to plates previously washed 5 times with PBST. After 1 h at 37°C, plates were washed again with PBST and incubated with goat anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase (Southern Biotechnology, USA) for 1 h at 37°C. Plates were washed in PBST and incubated with ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma, USA) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 min at room temperature. Reaction was stopped with 9N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution and visualized at A 490 nm. Titers were established as the reciprocal of serum dilution, which gave absorbance higher than mean values of respective non-immunized mouse samples.

### **Serum transfer**

Groups of pcTPA- or pcTPANS1-immunized mice were anesthetized with ketamine-xylazine and sacrificed 15 days after the second DNA dose. Animals were bled by cardiac puncture and sera were pooled and kept at -70°C until use. For passive immunization by antibody transfer, mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 300 µL of these sera, three hours before virus injection and every three days after challenge. Antibody transfer was also performed simultaneously with adoptive cell transfer experiments. In this case, animals were i.p. inoculated with one dose of 500 µL of pcTPANS1-immunized mouse sera before virus challenge. Animals were followed up for 21 days to determine survival rates.

### **Flow cytometry**

Splenocytes from Balb/c mice were isolated and erythrocytes were lysed by treatment with FACS lysing solution (BD Biosciences, USA), prepared according to manufacturer's instructions. Cells were washed in PBS and suspended in 1 % (w/v) bovine serum albumin (Sigma) prepared in PBS. Approximately 10<sup>6</sup> splenocytes were pelleted and stained for 30 min at 4°C in the dark with 20 µL of fluorescent monoclonal antibodies against: CD3-PE, CD4-FITC or CD4-Alexa Fluor 647, CD8-PerCP, B220-APC and CD45RB-FITC (BD Biosciences), previously titrated and mixed. Splenocytes were washed twice, suspended in 300 µL of PBS and read in a BD Accuri™ C6 Flow Cytometer (BD, USA). Cell populations were analyzed offline using FlowJo software (Tree Star, USA). For the *in vivo* cytotoxicity analysis, CFSE stained cells were readily analyzed without additional markers.

## Interferon- $\gamma$ ELISPOT Assay

Splenocytes from pcTPA- or pcTPANS1-immunized mice (n=5) were isolated 15 days after the last immunization and used in IFN- $\gamma$  ELISPOT test. Cells were isolated as described above and suspended in RPMI-1640 medium (Sigma) with gentamicin (0.04 mg/ mL, Sigma). The assay was performed with a synthetic peptide ( $^{265}$ AGPWHLGKL $^{273}$ ) present in the NS1 protein of DENV2, described as specific for CD8 $^{+}$  T cells [45]. The IFN- $\gamma$  ELISPOT mouse set (BD Biosciences) was used in accordance to the manufacturer's instruction. Briefly, 96-well plates were coated overnight at 4°C with 5  $\mu$ g/mL IFN- $\gamma$  capture monoclonal antibody in PBS, followed by washing and blocking with supplemented RPMI-1640 medium at room temperature. Splenocytes (10 $^6$  cells/well) were added to plates concomitant with the NS1 peptide in 200  $\mu$ L of RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS (peptide final concentration of 10  $\mu$ g/mL). Non-stimulated and concanavalin A (Con A, 5  $\mu$ g/mL) stimulated cells were used as negative and positive controls, respectively. Splenocytes were cultured for 20 h at 37°C in 5% CO $_2$ . Plates were washed, followed by incubation with biotinylated IFN- $\gamma$  detection antibody (2  $\mu$ g/mL) in PBS with 10% FBS. Plates were then washed with PBST and incubated with streptavidin horseradish peroxidase diluted 1:100. Spots were revealed with AEC substrate reagent set (BD Bioscience) at room temperature and counted with an Immunospot reader (Cellular Technology Ltd, USA) using the Immunospot Software Version 3. Results were expressed as the average of spot-forming cells (SFC) per 10 $^6$  cells, from triplicate wells, after subtraction of background values detected in non-stimulated splenocytes.

## *In vivo* cytotoxicity assay

The *in vivo* cytotoxicity assay was performed with transfer of NS1 peptide presenting cells to vaccinated recipient mice, based on a previously described protocol [46]. For target cells, splenocytes from naïve syngeneic mice, isolated as described above (item 2.7), were incubated with either 0.5 or 5  $\mu$ M of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, CellTrace, Invitrogen), CFSE $^{low}$  and CFSE $^{high}$ , respectively, in PBS at 37°C for 15 min. Cells were washed with RPMI-1640 supplemented with 1 % FBS, containing 1 % penicillin/streptomycin (10.000 U/mL, Invitrogen). The CFSE $^{high}$  cells were then incubated in the presence of 25  $\mu$ M of the NS1 peptide ( $^{265}$ AGPWHLGKL $^{273}$ ) at 37°C for 40 min, whereas CFSE $^{low}$  cells were incubated in medium only. After labeling and peptide pulsing, both cell populations were washed in medium without FBS and mixed in a proportion of 1:1. Cells were intravenously (i.v.) transferred to pcTPA- or pcTPANS1-inoculated mice, which received 10 $^7$  cells of each population (CFSE $^{low}$  and CFSE $^{high}$ ) in a single injection (100  $\mu$ L) by retro-orbital route. Part of these animals was previously challenged with DENV2 three days before cell transfer. Some animals were also depleted from CD4 $^{+}$  or CD8 $^{+}$  cells before cell transfer. Recipient mice were sacrificed 20h following cell transfer and splenocytes were isolated for flow cytometric analysis. Percentage of specific lysis was determined as follows: Cell lysis (%) = (1 - CFSE $^{high}$ /CFSE $^{low}$ ) x 100.

## Depletion of CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ cells

Mice were depleted from CD4 $^{+}$  or/and CD8 $^{+}$ T cells by inoculations of in-house produced ascitic fluids before or after virus challenge. Briefly, the in-house ascitic fluids were produced after i.p. inoculation of GK1.5 or 53-6.7 hybridomas (10 $^7$  cells / animal)



in nude Balb/c mice in order to obtain anti-CD4 or anti-CD8 antibodies, respectively. Ascitic fluids were collected approximately 15 days after hybridoma inoculations, centrifuged at 500g for 15 min at 4°C, and supernatants were aliquoted and stored at -70°C. For depletions, vaccinated Balb/c mice were i.p. inoculated with 25 µL of ascitic fluids in days -5, -3 and -1 prior to virus challenge. An additional dose of ascitic fluids was also administered 15 days after the challenge to ensure cell removal. Non-immunized animals were also depleted from CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells before virus challenge. Other controls included vaccinated and naïve animals challenged without depletion. Depletions were previously standardized and confirmed by flow cytometry.

### **T cell enrichments and adoptive transfer**

Spleens were collected from donors (pcTPANS1 or pcTPA-inoculated mice), obtained two weeks after the second DNA dose and without virus challenge, disrupted using wire mesh screens, and splenocytes were isolated in RPMI-1640, containing 1 % penicillin/streptomycin (10.000 U/mL, Invitrogen), supplemented with 5 % FBS. Cells were incubated in culture medium only for 1h and for another 1h in nylon wool column (previously packed and stabilized with RPMI in 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere), both at 37°C. After elution from nylon wool column with RPMI medium, in order to remove B lymphocytes, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells were further purified by negative selection, using a BioMag and cell sorting kit according to manufacturer's instructions (Bangs Laboratories Inc, USA). Briefly, T cell enriched suspension was incubated with ascitic fluids containing anti-CD4 or anti-CD8 antibodies for 30 min at 4°C, followed by incubation for 20 min with anti-rat IgG magnetic beads at room temperature. Suspensions were then submitted to a magnetic column for negative selection of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> cells. Finally, cells were collected in culture medium and counted in Neubauer chamber with trypan blue (Invitrogen) staining to assess cell viability.

For T cell transfer to naïve mice, CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> enriched cell suspensions (10<sup>6</sup> and 5 x 10<sup>5</sup> cells, respectively) were i.v. injected by retro-orbital route in a final volume of 100 µL. Injections were performed approximately 18h after virus challenge.

### **Statistics**

Data were analyzed with GraphPad prism software v5.1 (La Jolla, USA) using non-parametric tests. Statistical significance was determined using Mann-Whitney test for the analysis of data obtained in the hepatic enzymes quantification, ELISA, ELISPOT and flow cytometric assays. Survival distributions were evaluated using Log-Rank statistical test. Significant differences were defined with probability values inferior to 0.05 (\*p<0.05; \*\* p<0.01 and \*\*\*p<0.001).

## **Results**

### **Protection elicited by pcTPANS1 vaccination**

The previously constructed pcTPANS1 DNA vaccine contains the DENV2 NS1 gene fused to the t-PA signal sequence, for secretion of the recombinant NS1 protein. After immunization with this DNA vaccine, all Balb/c mice were protected against DENV2 when they were given a viral dose of 4 LD<sub>50</sub> (Fig. 1A). When the viral dose

was 10-fold increased (40 LD<sub>50</sub>), we could still observe significant survival rates (approximately 80%) in the vaccinated mouse group when compared to pcTPA-inoculated or naïve control groups, hence suggesting a robust and effective protection induced by the vaccine (Fig. 1B). Most of control animals died after virus infection, although approximately 35% of them did not present apparent clinical signs (hind leg paralysis and/or alteration of spinal cord) before death. Viremia was detected in most of naïve animals inoculated with DENV2 (71%), while only one vaccinated mice presented circulating virus (20%) (Tab. S1). Once animals were challenged with DENV2 30 days after immunization, survival rates in pcTPANS1-immunized group were around 90%, indicating a long-term protection conferred by this vaccination (Fig. 1C). In addition, survival was followed up to 40 days after virus infection and no death was observed after the first three weeks post challenge (Fig. 1C).

Previous reports suggested that the NS1 could play a role in inducing hepatic tissue damages. Thus, in order to evaluate whether the NS1 encoded by the pcTPANS1 DNA vaccine generates hepatic injury, we analyzed the liver of immunized animals. Histological analysis of the liver of vaccinated animals revealed a regular structure of the hepatic parenchyma and sinusoidal capillaries, without circulatory alterations or inflammatory infiltrates, similar to what we observed in naïve mice (Figs. 2A and 2B). Furthermore, quantification of serum levels of ALT and AST revealed similar values comparing pcTPANS1- and pcTPA-inoculated mice (Figs. 2C and 2D), thus confirming the absence of hepatic damages induced by the DNA vaccine.

### **Humoral immune response promoted by the pcTPANS1 vaccine.**

#### **Levels of anti-NS1 specific antibodies.**

Four weeks after receiving the first DNA dose, only animals vaccinated with the pcTPANS1 presented NS1-specific antibodies, detected by ELISA (Fig. 3). Besides, we observed a significant boost of this response 21 days after challenge with DENV2, with NS1-specific antibody titers approximately 9-fold higher than those detected before virus infection. Naïve or pcTPA-inoculated mice that survived virus challenge and presented high morbidity signs (hind leg paralysis and alteration of spinal cord), also exhibited anti-NS1 antibodies, although in significantly lower levels than those observed in vaccinated animals (Fig. 3).

#### **Contribution of anti-NS1 humoral response in protection.**

The protective role of the anti-NS1 antibody was investigated by a passive immunization experiment, where naïve mice were injected with several doses of serum samples collected from pcTPANS1- or pcTPA-inoculated animals. After challenge with DENV2 4 LD<sub>50</sub>, 50% of the animals that received anti-NS1 antiserum (obtained from pcTPANS1-immunized mice) survived virus infection, while 80% and 90% of control mice died (naïve animals or mice injected with serum obtained from animals inoculated with pcTPA plasmid) (Fig. 4A). Differences between control animals and mice passively immunized with anti-NS1 antiserum were statistically significant. However, protection conferred by the DNA vaccine was significantly higher than that generated by the serum transfer (Fig. 4A). On the other hand, the partial protection observed by

serum transfer was completely abolished when challenge was performed with DENV2 40 LD<sub>50</sub>, with survival rates similar to control groups (less than 15%), whereas 80% of vaccinated mice remained protected (Fig. 4B).

### **Activation of the cellular immune response by the pcTPANS1 vaccine.**

We next investigated whether a cellular immune response was induced in animals immunized with the pcTPANS1 DNA vaccine. The presence of activated T cell subpopulations was analyzed in spleen and blood samples of vaccinated and control animals (non-immunized or pcTPA-inoculated mice), before and after virus challenge. Activation was determined by the expression of CD45RB<sup>low</sup> on cell surface. No significant difference in the percentage of activated CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells was observed among all non-infected mouse groups. On the other hand, we found that the percentages of both TCD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> and TCD8<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> significantly increased in samples of vaccinated animals after challenge, when compared to control groups (naïve or pcTPA-inoculated mice after infection) (Fig. 5). Thus, these results suggested that the pcTPANS1 vaccine induced immune responses involving both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells.

We then characterized some aspects of this T cell response using one of the few DENV-NS1 peptides described in literature specific for Balb/c mice. Splenocytes from vaccinated or control animals were *in vitro* stimulated with the DENV-NS1 peptide (<sup>265</sup>AGPWHLGKL<sup>273</sup>), described as specific for CD8<sup>+</sup> T cells, in an ELISPOT assay for detection of IFN $\gamma$  production. Vaccinated animals presented significantly higher numbers of IFN $\gamma$ -producing cells when compared to samples collected from pcTPA-inoculated mice (Fig. 6A). Positive control using ConA as a mitogen confirmed the cell viability of all samples (Fig. 6B).

To assess the functional activity of cells responding specifically to this DENV-NS1 peptide, we analyzed its cytolytic activity using an *in vivo* cytotoxicity assay in pcTPANS1-vaccinated animals, submitted or not to virus challenge (Fig. 7A). Splenocytes isolated from naïve mice were pulsed with the DENV-NS1 peptide and labeled with high concentration of CFSE. Non-pulsed spleen cells, stained with low concentration of CFSE, were used to control non-specific cytolytic activity. Both cells, CFSE<sup>high</sup> and CFSE<sup>low</sup>, were mixed (Fig. 7B) and administered in vaccinated or pcTPA-inoculated mice three days after virus challenge. In the next day, animals were sacrificed and splenocytes were analyzed for detection of cell lysis, comparing high and low CFSE fluorescence intensity (Fig. 7C). We observed only discrete cell lysis in vaccinated animals without virus challenge, while lysis increased significantly when pcTPANS1-immunized mice were challenged with DENV2 (5-fold higher when compared to non-infected animals) (Fig. 7D). The cell lysis percentage in pcTPA-inoculated control animals, revealing non-specific activities, did not change after virus infection (Fig. 7D). When a similar experiment of cytotoxicity assay was performed with vaccinated mice depleted from CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells, we observed a significant decrease in cell lysis only after depletion of CD8<sup>+</sup> T cells. No significant difference was detected between non-depleted or CD4<sup>+</sup>-depleted vaccinated animals, as well as between control pcTPA-inoculated mice and vaccinated group depleted from CD8<sup>+</sup> cells (Fig. 8). Thus, results confirm the specificity of the DENV-NS1 peptide to CD8<sup>+</sup> lymphocytes with no involvement of CD4<sup>+</sup> cells.

## **Contribution of T cells in the protection induced by the pcTPANS1 DNA vaccine.**

In order to examine the role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the protection conferred by the pcTPANS1 vaccine, mice were submitted to antibody treatment for depletion of these cells, before and after virus challenge. Previously, the depletion procedure was standardized by several inoculations of ascitic fluid containing antibodies against CD4 or CD8, which yielded more than 99% reduction of such cells in mouse blood samples (Fig. S1 and Tab. S2). Depletion of CD8<sup>+</sup> cells reduced survival rates from approximately 80% to 45% of vaccinated animals challenged with DENV2 40 LD<sub>50</sub> (Fig. 9). Interestingly, all pcTPANS1-inoculated mice depleted from CD4<sup>+</sup> cells died after virus infection (Fig. 9). As expected, none of vaccinated animals depleted simultaneously from CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells survived virus challenge. Control naïve mice depleted from CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> also succumbed infection.

We subsequently evaluated the influence of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the protection against DENV2 by adoptive transfer of these cells collected from pcTPANS1-vaccinated animals (without virus challenge). The procedure for enrichment of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was previously standardized by negative selection using specific antibodies. In the CD4<sup>+</sup> enriched population, we detected a reduction of approximately 85% of CD8<sup>+</sup> cells, while the CD8<sup>+</sup> enriched population presented almost a 100% depletion of CD4<sup>+</sup> lymphocytes. All populations exhibited depletion of 90% of B220<sup>+</sup> cells (Tab. S3). For the adoptive transfer immunization procedure, we also included groups of animals that received cells with serum collected from vaccinated mice. Surprisingly, we only observed protection after challenge with DENV2 40 LD<sub>50</sub> in the mouse group that received CD4<sup>+</sup> T cells together with sera from vaccinated animals. In fact, 55% of animals in this group survived virus infection, which was not significantly different from the group of vaccinated mice (Fig. 10A). All other tested groups, including those receiving CD8<sup>+</sup> T lymphocytes together with serum or CD4<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup> T cells alone, were not significantly protected (Fig. 10A).

The NS1-specific antibody response was analyzed in serum sample of survived animals after the adoptive T cell/serum transfer experiment. As expected, mice receiving T cells and serum did not present a significant increase in anti-NS1 antibody titers 21 days after virus challenge (Fig. 10B), thus confirming the absence of previous B cells primed by this antigen. On the other hand, all pcTPANS1-vaccinated animals showed a boost of the humoral immune response, with a remarkable increase of anti-NS1 antibody levels (Fig. 10B).

## **Discussion**

In this report we investigated the contribution of the humoral and cellular immune responses induced by a DNA vaccine (pcTPANS1) encoding the NS1 protein in Balb/c mice challenged with DENV2. We observed that both responses are important for protection against dengue. In fact, results revealed that an effective protection against virus challenge was not achieved with antibody or T cells only, but rather with the combination of both responses.

DNA immunization may be an interesting approach for the development of a vaccine against dengue, since it is recognized as a useful tool to induce both arms of the immune system. Different DNA vaccines have been tested against DENV, most of them based on the dengue virus envelope protein [47-49]. However, several reports have

shown that the E protein is also involved in the phenomena of antibody dependent enhancement (ADE), where instead of protection by neutralization, antibodies against this protein may lead to an increase of virus replication [50-52]. Thus, the use of NS1 as antigen may be an alternative, since this protein is not involved in the ADE. On the other hand, other studies suggested an association between the immune response elicited by the NS1 and the pathogenesis of dengue with the generation of auto-antibodies. This fact was claimed to be important in regard to the damage effects observed in DENV infections, although the precise mechanism that lies behind it is not fully understood [27-34]. Anti-NS1 antibodies were shown to cross-react with elements such as platelets, fibrinogen and hepatic endothelial cells, also leading to increased serum levels of ALT and AST [27,31,34,53]. However, there is an apparent paradox between the disease recovery and high levels of anti-NS1 antibodies detected in convalescent patients [18-20]. Hence, in the present work, besides mapping the protective immune response elicited by the plasmid pcTPANS1, we also investigated whether this vaccine induces an hepatotoxicity in immunized mice. Histological analysis showed no parenchyma or vascular damages in the hepatic tissue of these animals. Furthermore, vaccinated mice presented serum levels of the liver enzymes ALT and AST similar to control animals (pcTPA-inoculated mice), thus confirming preserved hepatic function. Therefore, our results suggested that the *in vivo* expression of the NS1 mediated by the pcTPANS1 vaccine, and consequently the immune response elicited against it, is safe without noticeable pathogenic effects in this mouse model.

We have previously shown that mice immunized with the pcTPANS1 presented antibodies that recognized mainly conformational epitopes in the NS1 protein [23]. It is known that secretion of the recombinant protein mediated by DNA vaccines is crucial for induction of an effective humoral immune response [54-56]. In this regard, we have highlighted before that secretion of the recombinant protein due to the t-PA signal sequence, encoded by the pcTPANS1, was more efficient to generate protection against DENV when compared to the NS1 native signal peptide (present on the C-terminal region of E protein) encoded in another DNA vaccine [24]. In the present study, we confirmed protection yielded by the pcTPANS1 against DENV2. Besides, we observed that a 10-fold increase of viral LD<sub>50</sub> (from 4 to 40) did not cause a significant impact on the survival rates of vaccinated animals challenged with DENV2. Hence, the pcTPANS1 elicited a robust protective immunity. Furthermore, animals also survived virus infection when challenge was given one month after the last DNA dose, thus suggesting long-term protection induced by the pcTPANS1. Unfortunately, mice could not be challenged after a long time post immunization because aged animals became resistant to virus infection.

We next focused our efforts on the investigation of components of the immune response that are involved in protection elicited by the pcTPANS1. Levels of anti-NS1 antibodies increased considerably after virus challenge, characterizing memory and booster response after the secondary exposure to the antigen. We observed that passive immunization with several doses of anti-NS1 antiserum, obtained from pcTPANS1-inoculated mice, yielded partial protection against a lethal challenge with DENV2. These data corroborate with the literature regarding dengue [21] and other flaviviruses, such as yellow fever [57] and japanese encephalitis virus [58], in which anti-NS1 polyclonal serum transfer seemed to confer a limited defense against lethal virus dose. In addition, we found that this protection was completely abrogated when mice were challenged with a 10-fold higher viral dose (40 LD<sub>50</sub>), thus suggesting that only anti-NS1 antibodies were not able to control high viral load infection.

In regard to the cellular immune response induced by the pcTPANS1, we observed activation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, identified by low expression of CD45RB on cell surface. This response was significantly detected only after virus inoculation. This seems to be the ideal situation for a vaccine, where an exacerbated response without the presence of the pathogen is not desirable. In sequence, we found that vaccination with the pcTPANS1 induced a cellular immune response specific to the DENV-NS1 peptide <sup>265</sup>AGPWHLGKL<sup>273</sup>, described as specifically reactive for CD8<sup>+</sup> T cells (ref). We noted that splenocytes isolated from vaccinated animals produced IFN- $\gamma$  after *in vitro* stimulation, demonstrating the potential of a CD8<sup>+</sup> T cell induction after vaccination. Under *in vivo* conditions, we also detected a T cell cytotoxic activity directed to the same peptide. Besides, the *in vivo* cytotoxicity was observed mainly after virus challenge, in accordance to results discussed above for detection of T cells activation. Furthermore, such activity was significant abolished when mice were depleted from CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, thus confirming the specificity of the peptide used in this assay, with no participation of CD4<sup>+</sup> cells.

Studies with rhesus macaques also pointed that NS1-specific CD8<sup>+</sup> T cells are activated in dengue infection, with the production of IFN- $\gamma$  [59]. Part of these cells was positive to CD107a on their surface, which is a degranulation marker and indicates a cytotoxic activity [59]. Moreover, previous reports have demonstrated the participation of CD8<sup>+</sup> T cell response in protection against dengue, with a correlation between its cytotoxic activity and secretion of IFN- $\gamma$ , which contributes to viral clearance [60]. However, in the study of *Yauchet al.* [60] the cell response was not directed to the NS1. Our initial results also suggested that CD8<sup>+</sup> T cells would play a role in the protection mediated by the pcTPANS1 DNA vaccine. However, in our next set of experiments we observed that the pcTPANS1 induced a CD8<sup>+</sup> T cell response, but its significance in inducing protection seemed to be less important when compared to that of CD4<sup>+</sup> T cells.

In fact, approximately 45% of animals immunized with the pcTPANS1 and depleted from CD8<sup>+</sup> cells survived virus challenge. In contrast, all vaccinated animals depleted from CD4<sup>+</sup> cells died after infection. *Yauchet al.* [61] also showed that CD4<sup>+</sup> T cells are important for viral clearance. Authors suggested that CD8<sup>+</sup> T cells play an important protective role in primary dengue infection, while CD4<sup>+</sup> T cells are essential in the secondary response, which would be fundamental for vaccination [60,61]. One possible reason for such importance in secondary response would be a helper activity of CD4<sup>+</sup> T cells for activation of B and/or CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. However, we found that transfer of CD4<sup>+</sup> together with CD8<sup>+</sup> enriched T cell populations from vaccinated mice was not protective in animals challenged with the DENV2 40 LD<sub>50</sub>. Thus, results exclude the hypothesis that the helper function of CD4<sup>+</sup> over CD8<sup>+</sup> T cells would consist the major mechanism involved in the protection here conferred by CD4<sup>+</sup> lymphocytes induced by the pcTPANS1. On the other hand, several animals receiving enriched CD4<sup>+</sup> T cell population together with anti-NS1 antiserum, both obtained from vaccinated mice without virus challenge, survived dengue infection. Besides, survival rates in this animal group did not significantly differ from pcTPANS1-immunized mice. Furthermore, most of animals that received only one dose of anti-NS1 antiserum did not survive virus challenge. It is important to emphasize that, although enriched CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cell populations still contained other cells (not CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> or B cells), these contaminants were present in both enriched populations and, therefore, seem not to interfere with the results demonstrating the importance of the CD4<sup>+</sup> T cells in the protection elicited by the pcTPANS1. As expected, no significant increase in NS1-specific serum antibody levels was detected in animals that received CD4<sup>+</sup> cells together with anti-NS1 antiserum. Hence, these results indicated that protection observed here by

the transfer of pcTPANS1-elicited CD4<sup>+</sup> T cells is not because of a helper activity of these cells over B lymphocytes, which would be also transferred from pcTPANS1-vaccinated mice as a contaminant, leading to a booster of the humoral immune response.

In the present study we used the experimental murine model of Balb/c challenged intracerebrally with a brain mouse adapted DENV2 for testing and mapping the protective immune response induced by the pcTPANS1 DNA vaccine. Unfortunately, there is no immunocompetent murine model that can mimic all the disease spectrum of dengue as observed in humans. We chose this approach since our main goal was to map the immune response elicited by our vaccine and this is an immunocompetent mouse model available. Besides, this model is widely used for vaccines tests against dengue virus [65-70]. Although the symptoms manifested in this model are not exactly the same as described in humans, it has been reported that dengue infection can also lead to encephalitis in some fatal cases. Moreover, detection of viral antigens or dengue RNA was also observed in the brain of these patients [62-64]. Such evidences indicate the involvement of the central nervous system in the pathogenesis of dengue. On the other hand, in the chosen mouse model not all animals die after the development of symptoms related to central nervous system dysfunction. In fact, approximately 35% of mice succumbed infection without exhibiting morbidity (hind leg paralysis and/or alteration of spinal cord). Furthermore, viremia was detected in most of naïve animals after the i.c. inoculation, thus indicating that virus can also spread systemically with some similarity to what is observed in humans.

To conclude, we understand that the robust protective immunity generated by the pcTPANS1 in mice is strongly given by CD4<sup>+</sup> T cells and the presence of antibodies. Nevertheless, the mechanism involved in this protection is yet to be elucidated and further studies will be necessary to clarify this issue.

### **Acknowledgments**

We are greatly in debt to Dr. Luis Carlos S. Ferreira (Laboratory of Vaccine Development, Department of Microbiology, USP, Brazil) for kindly supplying the recombinant NS1 protein used in ELISA assays. We also thank the ELISPOT-Plataform (Fiocruz) for the use of its facilities and Heloisa Diniz (Service of Image Production and Processing, IOC, Fiocruz, Brazil) for the technical assistance with the figures.

### **References**

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW *et al.* (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496-504.
2. Gubler D.J (2012) The economic burden of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 86: 743.
3. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD (2009) Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 22: 564-581.

4. Chuansumrit A, Chaiyaratana W (2014) Hemostatic derangement in dengue hemorrhagic fever. *Thromb Res* 133: 10-16.
5. Lindenbach BD & Rice CM. (2001) Flaviviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*. Fields B. N. Knipe D. M. Howley P. M. (Eds.) 4th ed. 991-1024.
6. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA *et al.* (1999) Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion. *J Virol* 73: 6104–6110.
7. Jacobs MG, Robinson PL, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR (2000) Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J* 14: 1603-1610.
8. Somnuk P, Hauhart RE, Atkinson JP, Diamond MS, Avirutnan P (2011) N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion cell-surface expression hexamer stability and interactions with human complement. *Virology* 413: 253–264.
9. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W (2000) An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 38: 1053-1057.
10. Alcon-LePoder S, Sivard P, Drouet MT, Talarmin A, Rice C *et al.* (2006) Secretion of flaviviral nonstructural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis. *Novartis Found Symp* 277: 233–247.
11. Muller DA, Young PR (2013) The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology immunology role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* 98:192-208.
12. Mackenzie JM, Jones MK, Young PR (1996) Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220: 232-240.
13. Lindenbach BD, Rice CM (1997) Trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol* 71: 9608-9617.
14. Lindenbach BD, Rice CM (1999) Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 73: 4611-4621.
15. Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA (1997) Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA and of NS2B with NS3 in virus-induced membrane structures. *J Virol* 71: 6650-6661.
16. Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. (2000) Cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. *J Virol* 74: 3253-3263.



17. Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend R.R. *et al.* (2006) West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19111–19116.
18. Kuno G, Vorndam AV, Gubler DJ, Gomez I (1990) Study of anti-dengue NS1 antibody by Western blot. *J Med Virol* 32: 102-108.
19. Churdboonchart V, Bhamarapavati N, Peampramprecha S, Sirinavin S (1991) Antibodies against dengue viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 44: 481-493.
20. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L *et al.* (2000) Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 62: 224-232.
21. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh E (1987) Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus nonstructural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 68: 853-857.
22. Henchal EA, Henchal LS, Schlesinger JJ (1988) Synergistic interaction of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J Gen Virol* 69: 2101-2107.
23. Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhão AT, Barth OM *et al.* (2006). Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine* 24: 195-205
24. Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS *et al.* (2007) DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology* 358: 413-423.
25. Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK *et al.* (2003) Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine Against dengue 2 virus in mice. *Vaccine* 21: 3919–3929.
26. Wan SW, Lu YT, Huang CH, Lin CF, Anderson R *et al.* (2014) Protection against dengue virus infection in mice by administration of antibodies against modified nonstructural protein 1. *PLoS One* 9: e92495
27. Falconar AK (1997) The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* 142: 897-916.
28. Falconar AK (2007) Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE type motifs on the nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: implications for diagnosis pathogenesis and vaccine design. *Clin Vaccine Immunol* 5: 493-504.

29. Liu J, Chiu C, Chen Y, Wu H (2011) Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by autoantibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus. *J Biol Chem* 11: 9726-9736.
30. Chang HH, Shyu HF, Wang YM, Sun DS, Shyu RH *et al.* (2002) Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): arginine glycine aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. *J Infect Dis* 186: 743-751.
31. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS *et al.* (2003) Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol* 69: 82-90.
32. Lin C, Chiu S, Hsiao Y, Wan S, Lei H, *et al.* (2005) Expression of Cytokine chemokine and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein. *J Immunol* 174: 395-403.
33. Oishi K, Inoue S, Cinco MT, Dimano EM, Alera MT, *et al.* (2003) Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *J Med Virol* 71: 259-64.
34. Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC *et al.* (2007) Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost* 5: 2291-2299.
35. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN (1970) Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 42: 311-328.
36. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N *et al.* (2003) Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 9: 921-927.
37. Kinney RM, Huang CYH (2001) Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology* 44: 176-197.
38. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Brian RM (2007) Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 5: 518-528.
39. Heinz FX, Stiasny K (2012) Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 30: 4301-4306.
40. Ishiikawa T, Yamanaka A, Konishi E (2014) A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flavivirus for which vaccines are not yet available. *Vaccine* 32: 1326-1337.
41. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P *et al.* (2012) Protective efficacy of the recombinant live-attenuated CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomized controlled phase 2b trial. *Lancet* 380: 1559-1567.

42. Paes MV, Lenzi HL, Nogueira ACM, Nuovo GJ, Pinhao AT *et al.* (2009) Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest* 89: 1140-1151.
43. Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blümel G. (1984). A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone ketamine-xylazine carfentanyl-etomidate). *Res Exp Med* 184: 159-169.
44. Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, Costa SM *et al.* (2010) Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods* 167: 186-192.
45. Gao G, Wang Q, Dai Z, Calcedo R, Sun X *et al.* (2008) Adenovirus-based vaccines generate cytotoxic T lymphocytes to epitopes of NS1 from dengue virus that are present in all major serotypes. *Hum Gene Ther* 19: 927-936.
46. Martin DL and Tarleton RL (2005) Antigen-Specific T Cells Maintain an Effector Memory Phenotype during Persistent. *J Immunol* 174: 1594-1601.
47. Raviprakash K, Marques E, Ewing D, Lu Y, Phillips I *et al.* (2001) Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. *Virology* 290: 74-82.
48. Danko JR, Beckett CG, Porter KR (2011) Development of dengue DNA vaccines. *Vaccine* 29: 7261-7266.
49. Azevedo AS, Gonçalves AJ, Archer, Freire MS, Galler *Ret al.* (2013) The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. *PLoS One* 8: e58357.
50. Halstead SB, O'Rourke EJ (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146: 201-217.
51. Halstead SB. Dengue (2007) *Lancet* 370: 1644-1652.
52. Murphy BR, Whitehead SS (2011) Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol* 29: 587-619.
53. Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC *et al.* (2008) Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab. Invest* 88: 1079–1089.
54. Boyle JS, Koniaras C, Lew AM (1997) Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol* 9: 1897–1906.

55. Inchauspe G, Vitvitski L, Major M, Jung G, Spengler U *et al.* (1997) Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol* 16: 185–195.
56. Alves AMB, Lásaro MO, Almeida DF, Ferreira LC (1999) New vaccine strategies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. I: DNA vaccines against the CFA/I fimbrial adhesin. *Braz J Med Biol Res* 32: 223-229.
57. Schlesinger JJ, Brandriss M W, Cropp CB, Monath TP (1986) Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J Virol* 60: 1153–1155.
58. Li Y, Lu D.C.P, Duong V, Yu Y, Deubel V (2012) Protective immunity to Japanese encephalitis virus associated with anti-NS1 antibodies in a mouse model *Virology* 9: 135.
59. Mladinich KM, Piaskowski SM, Rudersdorf R, Eernisse CM, Weisgrau KL *et al.* (2012) Dengue virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes target NS1, NS3 and NS5 in infected Indian rhesus macaques. *Immunogenetics* 64: 111-121
60. Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J *et al.* (2009). A protective role for dengue virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 182: 4865-4873.
61. Yauch LE, Prestwood TR, May M, Morar MM, Zellweger RM *et al.* (2010) CD4<sup>+</sup> T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *J Immunol* 185: 5405-5416.
62. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RMP, Cuzzimaya T *et al.* (1997) Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol* 16: 204-208.
63. Ramos C, Sánchez G, Pando RH, Baquera J, Hernández D *et al.* (1998) Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol* 4: 465-468.
64. Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, de Freitas MR, Zalis M *et al.* (2011) Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. *J Neurol Sci* 303: 75-79.
65. Porter KR, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I *et al.* (1998) Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immunostimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol* 143: 997-1003.
66. Caufour OS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira *et al.* (2001) Construction characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Res* 79: 1-14.

67. Valdes I, Bernardo L, Gil L, Pavon A, Lazo L *et al.* (2009) A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2 in a highly aggregated form induces a functional immune response and protection in mice. *Virology* 394: 249–258.
68. Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang *Get al.* (2010) Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine* 28: 2705-2715.
69. Azevedo AS, Yamamura AM, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M *et al.* (2011) DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. *PLoS One* 6: e20528.
70. Costa SM, Yorio AP, Gonçalves AJ, Vidale MM, Costa EC *et al.* (2011) Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS One* 6: e25685.

## Figure Legends

**Figure 1. Survival rates of vaccinated or non-immunized Balb/c mice after challenge with DENV2.** Groups of Balb/c mice (n=10) 4 weeks old were inoculated with two doses of the DNA vaccine pcTPANS1 or the control plasmid pcTPA (100 µg of DNA/dose given two weeks apart). **(A and B)** Two or **(C)** four weeks after the second dose, animals were intracerebrally inoculated with **(A)** 4 LD<sub>50</sub> or **(B and C)** 40 LD<sub>50</sub> of neuroadapted DENV2 NGC strain. Naïve animals were also challenged with 4 or 40 LD<sub>50</sub> DENV2. Animals were observed **(A and B)** for 21 or **(C)** 40 days after challenge for evaluation of survival rates. Asterisks indicate significant differences between vaccinated and control animals using Log-Rank statistical test. \*\*\* p<0.001, \*\*p<0.01.

**Figure 2. Histological analysis of pcTPANS1-vaccinated mouse liver and quantification of hepatic enzymes.** Representative histological analysis of control (naïve) and vaccinated mice stained with H.E. Liver of **(A)** naïve or **(B)** vaccinated mice immunized with two doses of the pcTPANS1 presenting hepatic parenchyma and sinusoidal capillary with regular structure. Central Vein (CV); Sinusoids capillaries (SC). Quantification of **(C)** alanine aminotransferase (ALT) and **(D)** aspartate aminotransferase (AST) in serum samples of pcTPA- and pcTPANS1-inoculated mice (n = 5). Values between both groups were not statistical different when evaluated by Mann-Whitney test.

**Figure 3. Titration of NS1-specific antibodies.** NS1-specific antibodies were quantified in mouse serum samples (n = 5) using recombinant NS1 protein as a solid phase antigen in ELISA plates. Sera were collected before and after DENV2 challenge. Data are represented as mean and standard error of the mean. Asterisks indicate significant differences between groups using Mann-Whitney statistical test. \*\*\* p<0.001.

**Figure 4. Survival rates of mice passively immunized with anti-NS1 polyclonal antiserum and challenged with DENV2.** Balb/c mice (n=10) were intraperitoneally injected with several doses of anti-NS1 polyclonal antiserum before and after challenge with DENV2. Sera for immunization were obtained from pcTPANS1- or pcTPA-inoculated animals. After challenge with **(A)** 4 LD<sub>50</sub> or **(B)** 40 LD<sub>50</sub> mice were monitored for 21 days for the establishment of survival curves. Controls also included pcTPANS1-immunized (DNA vaccine) or naïve mice challenged with

DENV2. Asterisks indicate significant differences between groups using Log-Rank statistical test. \* $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 5. Activation of T cells in vaccinated Balb/c mice challenged with DENV2.** Balb/c mice (5 to 10 per group) were previously immunized with pcTPANS1 and further challenged with DENV2. Control groups (non-vaccinated or inoculated with pcTPA plasmid) were also challenged. Spleen and blood samples were collected from animals at days 0 and 7 after infection and prepared for multicolor flow cytometry analysis using anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD45RB. Values are expressed as median and interquartile range of CD45RB<sup>low</sup> cells gated in CD3<sup>+</sup> cells and (A) CD8<sup>+</sup> or in (B) CD4<sup>+</sup> T cells. Statistical differences between groups were evaluated using Mann-Whitney test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ ). Data are representative of three independent experiments.

**Figure 6. Production of IFN- $\gamma$  by splenocytes from pcTPANS1-immunized mice.** Spleens obtained from Balb/c mice inoculated with pcTPANS1 or pcTPA (n=5) were collected 2 weeks after the second DNA dose and processed for IFN- $\gamma$  ELISPOT assay. (A) Splenocytes were stimulated with the NS1 synthetic peptide <sup>265</sup>AGPWHLGKL<sup>273</sup> or (B) with concavalin A as a positive control. Numbers of spot-forming cells were quantified 24h after stimulation. Values are expressed as mean of IFN- $\gamma$  spot forming cells (SFC) and standard error of the mean. Asterisks indicate statistically significant difference using Mann-Whitney test. \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 7. *In vivo* cytotoxicity assay.** (A) Schematic representation of the assay. Balb/c mice inoculated with pcTPANS1 or pcTPA plasmids challenged or not with DENV2 (40 LD<sub>50</sub>) received a mixture of splenocytes obtained from naïve mice incubated with CFSE 0.5  $\mu$ M or 5  $\mu$ M (CFSE<sup>low</sup> and CFSE<sup>high</sup>, respectively). CFSE<sup>high</sup> splenocytes were previously pulsed *in vitro* with the synthetic peptide <sup>265</sup>AGPWHLGKL<sup>273</sup>. Animals (n = 6) were sacrificed 20h after cell transference and splenocytes were collected and analyzed by flow cytometry. (B) Cytometric dot plot and histogram representing the mixture (1:1) of CFSE<sup>high</sup> (M1) and CFSE<sup>low</sup> (M2) splenocytes (inside R1) used for cell transference. (C) Representative dot plots of CFSE<sup>high</sup> and CFSE<sup>low</sup> splenocytes (top and bottom regions respectively) observed in recipient mice 20h after cell transference. Values represent the number of CFSE positive cells normalized to 20,000 considered events. (D) Percentages of cell lysis observed in analyzed groups calculated as follows: Cell lysis (%) = (1 -

CFSE<sup>high</sup>/CFSE<sup>low</sup>) x 100. Data are expressed as mean and standard error of the mean. Asterisks indicate statistically significant differences using Mann-Whitney test.\*\* p<0.01.

**Figure 8. *In vivo* cytotoxicity assay with T cell depleted recipients challenged with DENV2.** The *in vivo* cytotoxicity assay was carried out as described in Figure 7 and groups of recipient mice (n = 6) were depleted from CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells by inoculation of anti-CD4 or anti-CD8 antibodies, respectively. Values represent percentages of cell lysis as described in Figure 7, expressed as mean and standard error of the mean. Asterisks indicate statistically significant differences between groups Mann-Whitney test. \* p<0.05.

**Figure 9. Survival rates of T cell depleted pcTPANS1-immunized mice after challenge with DENV2.** Balb/c mice immunized with pcTPANS1 (n=10) were intraperitoneally injected with 3 doses of anti-CD4 or anti-CD8 ascitic fluid before virus challenge (40 LD<sub>50</sub>) and one dose after infection. Controls included non-immunized or vaccinated mice challenged with DENV2. Animals were monitored for 40 days after challenge. Data represent compilation of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences using Log-Rank statistical test. \*\*\*p<0.001.

**Figure 10. Protection induced by T cell adoptive transfer and antibody response (A)** Survival rates of Balb/c mice after T cell adoptive transfer and challenge with DENV2. Enriched CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cell populations isolated from splenocytes of pcTPANS1-immunized mice were intravenously transferred to naïve Balb/c recipients. Animals were inoculated only with isolated cells or together with pooled sera (intraperitoneally injected) obtained from pcTPANS1-immunized mice. One day after cell transference mice were challenged with DENV2 (40 LD<sub>50</sub>) and monitored for the next 21 days. Data represent a compilation of two independent experiments with groups of 10 animals in each test (n = 20). Asterisks indicate significant differences using Log-Rank statistical test. ns (non-significant); \*p<0.05; \*\*\*p<0.001. **(B)** Individual NS1-specific antibody response in serum samples collected from survived animals of one representative experiment evaluated by ELISA. Anti-NS1 antibody was also assessed in pooled sera (pcTPANS1<sup>a</sup>) used for inoculations.

**Figure S1. Depletion of T cells in Balb/c mice.** Representative cytometric dot plots showing percentages of TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> cells observed in peripheral blood of



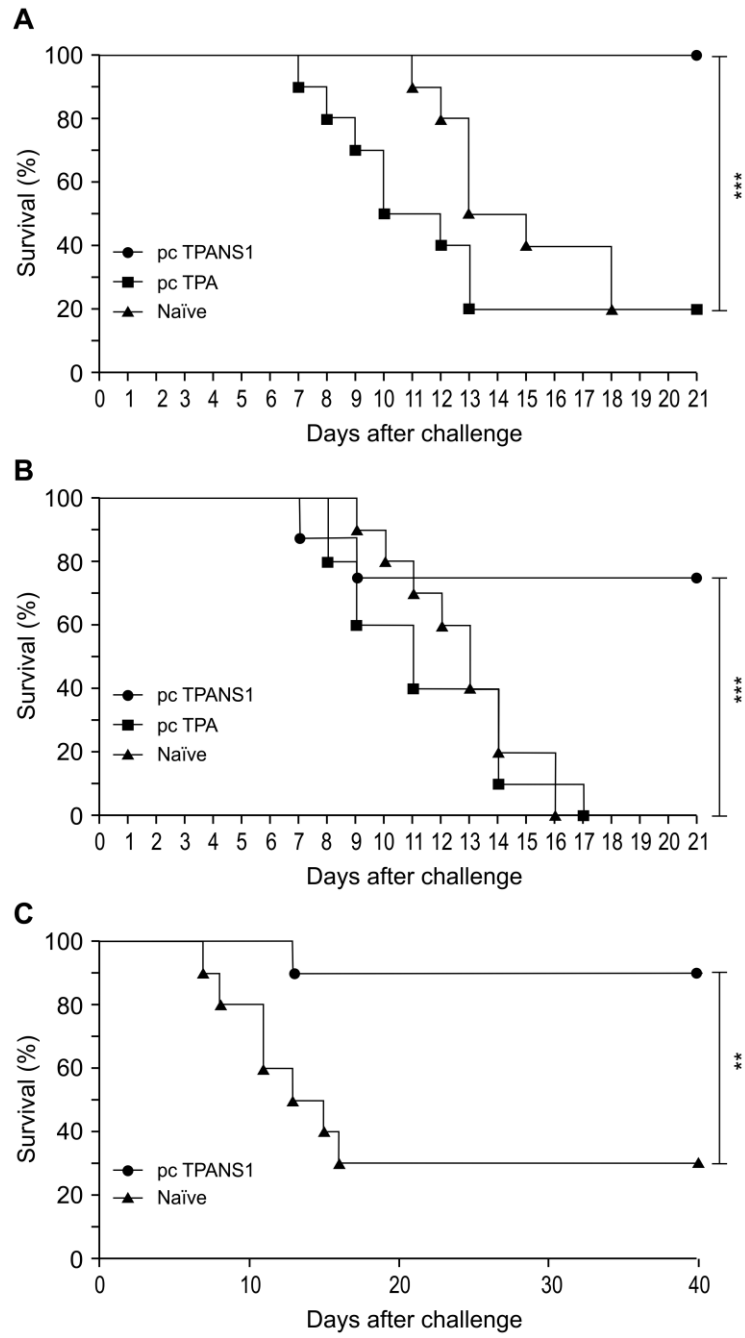
naïve or T cell-depleted Balb/c mice. Anti-CD8 or anti-CD4 antibodies were intraperitoneally administered for depletion of lymphocyte populations.

**Table S1.** Virus detection in serum samples of naïve and vaccinated mice infected with DENV2.

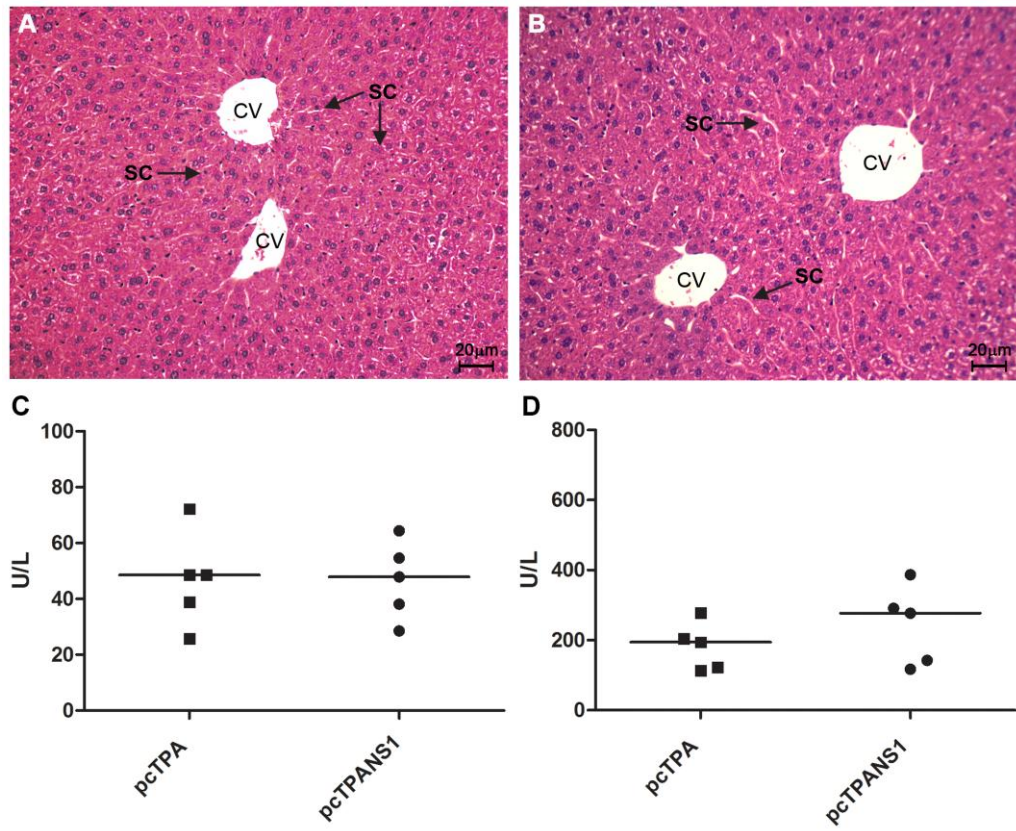
**Table S2.** Percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in depleted Balb/c mice.

**Table S3.** Percentage of CD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup>T cells in enriched populations from Balb/c mice.

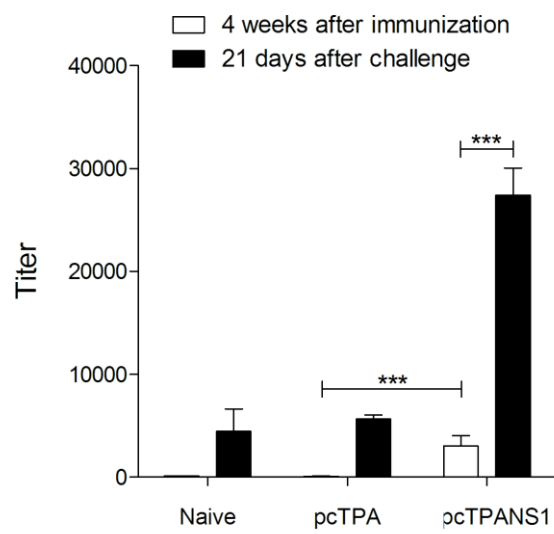
**Figure 1**



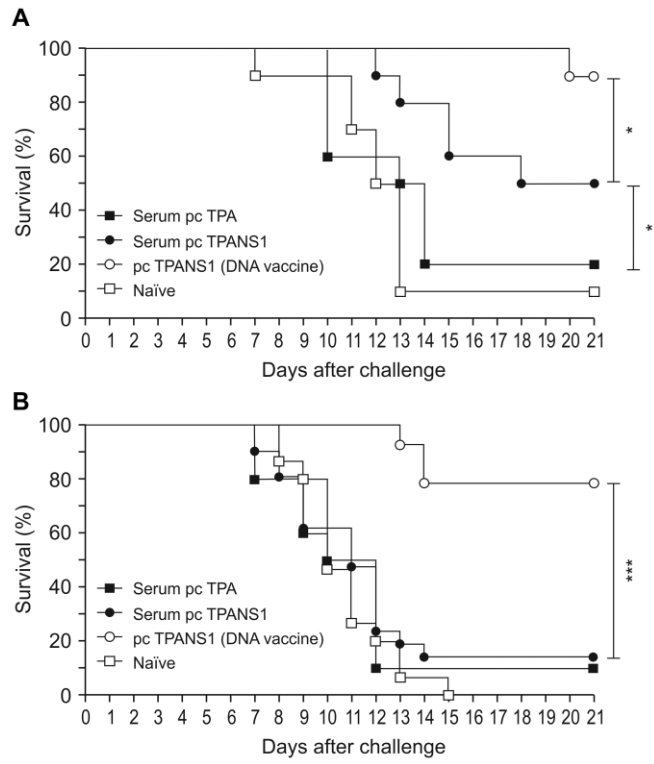
**Figure 2**



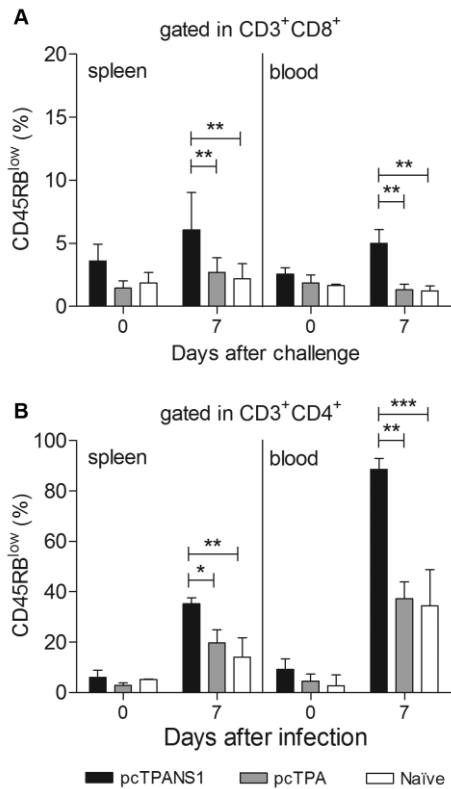
**Figure 3**



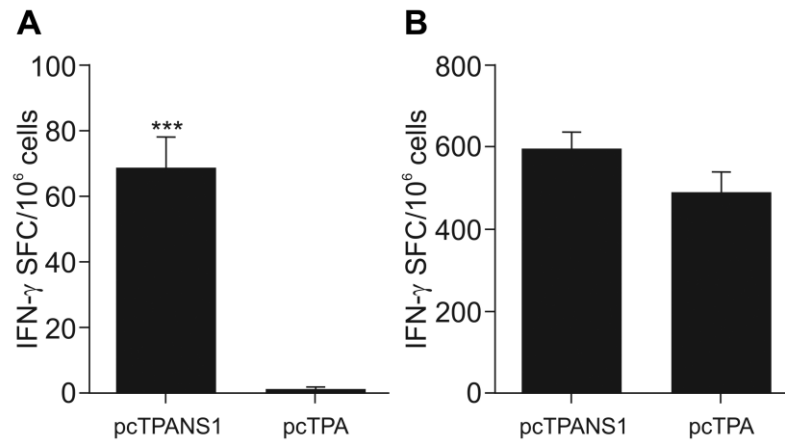
**Figure 4**



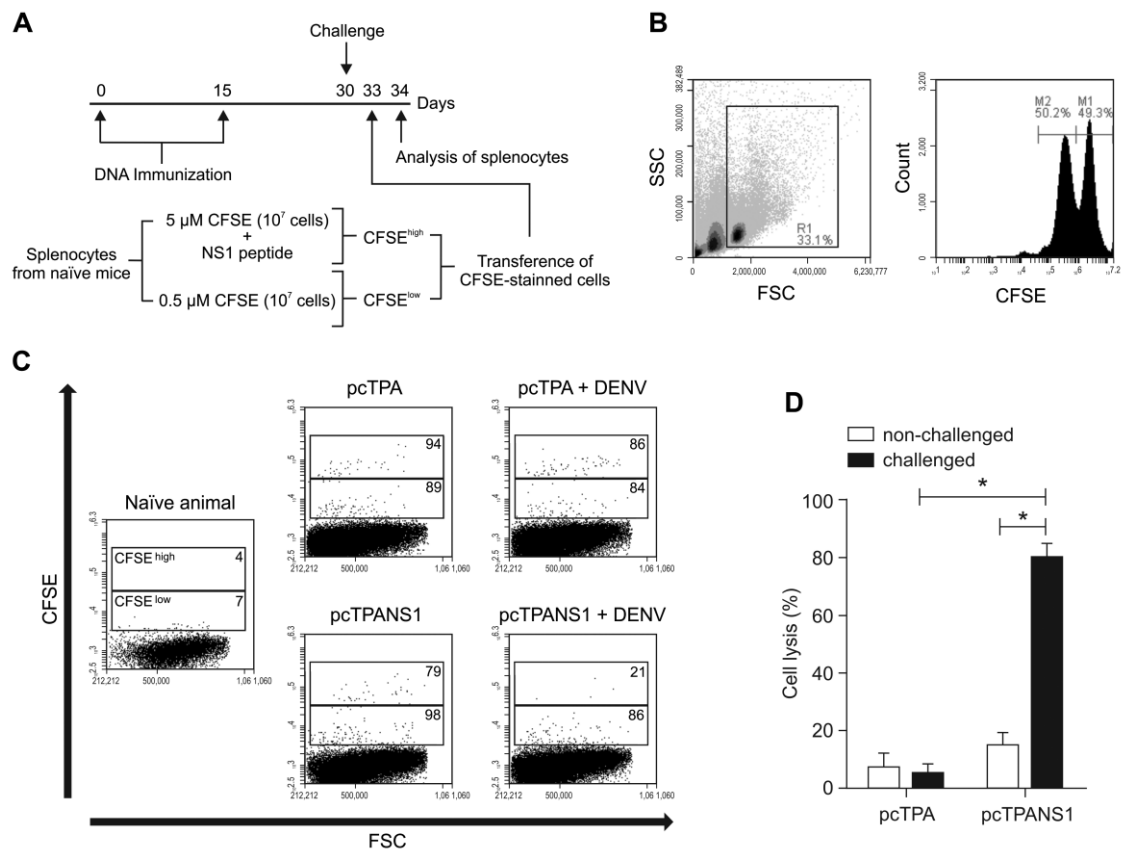
**Figure 5**



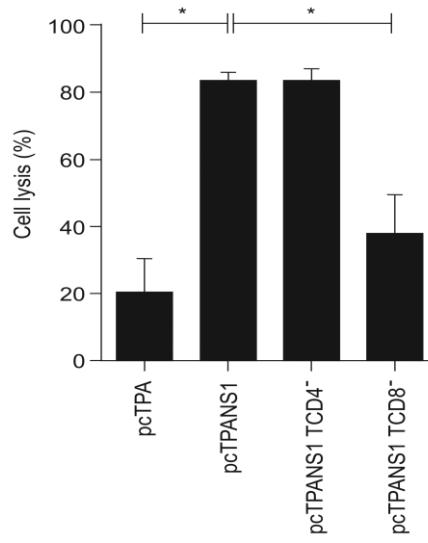
**Figure 6**



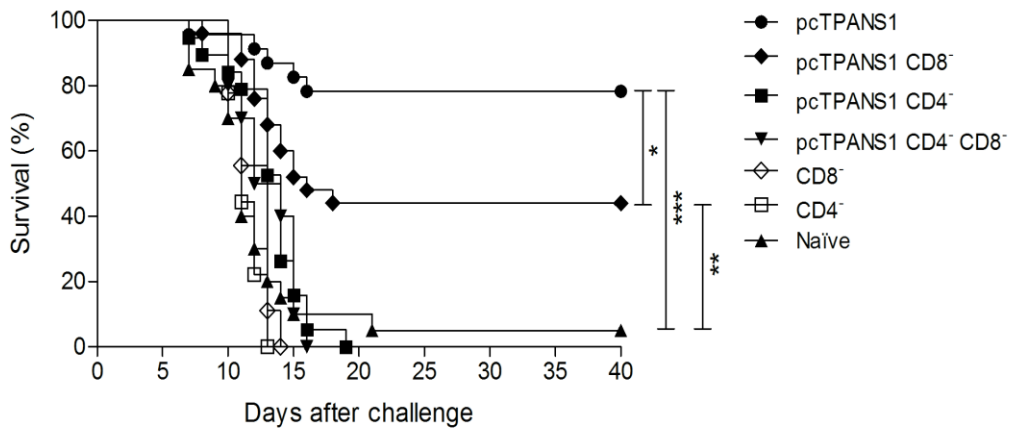
**Figure 7**



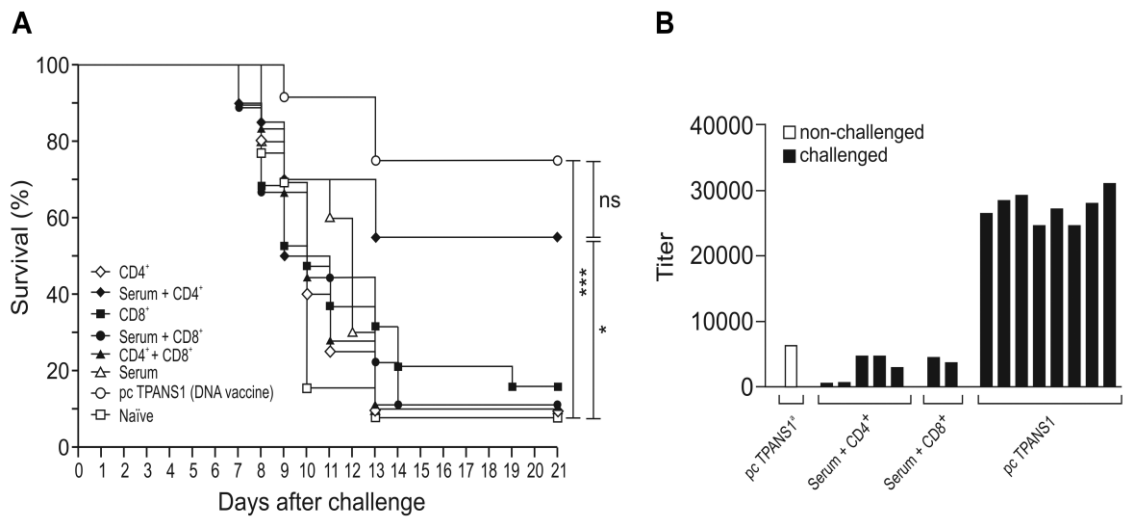
**Figure 8**



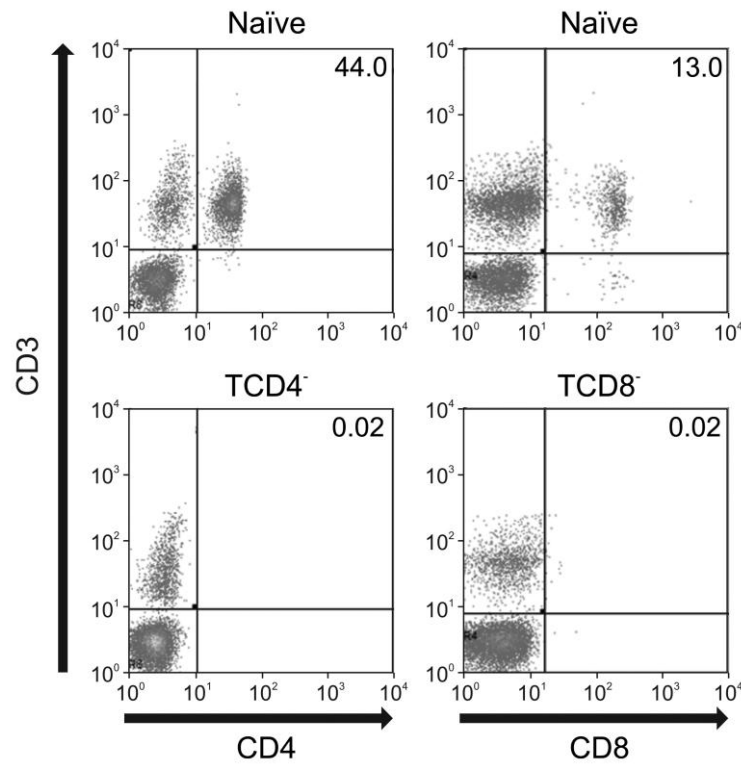
**Figure 9**



**Figure 10**



**Figure S1**



**Table S1**

	Non-vaccinated	pCTPANS1-vaccinated
Number of animals	5 (7)*	1(5)*

\* Virus was detected by plaque assay in Vero cells 9 days after infection with DENV2 (40 LD50). Values represent the number of positive animals out of a total number of mice (between parentheses).

**Table S2**

	Non-depleted (%)	CD4 depletion (%)	CD8 depletion (%)
CD4 <sup>+</sup>	44,3	0.02 (99.9)*	30,1
CD8 <sup>+</sup>	13,2	25,0	0.02 (99.8)*

\* values between parenthesis correspond to percentages of depletion

**Table S3**

	Splenocytes (%)	CD4 <sup>+</sup> enriched population (%)	CD8 <sup>+</sup> enriched population (%)
CD4 <sup>+</sup>	34,4	58,5	0.06 (99.8)*
CD8 <sup>+</sup>	13,3	2.04 (84.6)*	31,5
B220 <sup>+</sup>	41,4	4.1 (90.1)*	4.1 (90.1)*

\* values between parenthesis correspond to the percentage of non-target cell depletion in the enriched population