

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Daniel Cisalpino

**SOCS-2 DESEMPENHA UM IMPORTANTE PAPEL REGULADOR EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO PELO DENGUE**

Belo Horizonte

2011

Daniel Cisalpino

**SOCS-2 DESEMPENHA UM IMPORTANTE PAPEL REGULADOR EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO PELO DENGUE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Ciências: Microbiologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Danielle da Glória
de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Martins
Teixeira

Belo Horizonte

2011

043

Cisalpino, Daniel de Paula Menezes Silva.

SOCS-2 desempenha um importante papel regulador em um modelo experimental de infecção pelo Dengue [manuscrito] / Daniel de Paula Menezes Silva Cisalpino. – 2011.

89 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Danielle da Glória de Souza. Coorientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Dengue. 3. Proteínas Supressoras da Sinalização de Citocina. 4. Araquidonato 5-Lipoxigenase. 5. Lipoxinas. I. Souza, Danielle da Glória de. II. Teixeira, Mauro Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Co-orientador: Prof. Mauro Martins Teixeira
Relator e Suplente: Prof. Gustavo Batista de Menezes

Às 10:00 horas do dia 18 de fevereiro de 2011, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelo Profs. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), e pelo Dr. Flávio Almeida Amaral (Pós-Doutorando do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG) e a Profa. Daniele da Glória de Souza - Orientadora, para julgar o trabalho final "SOCS-2 desempenha um importante papel regulador em um modelo experimental de infecção pelo Dengue", do aluno Daniel de Paula Menezes Silva Cisalpino, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Maria Aparecida de Resende Stoianoff - Subcoordenadora do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2011.

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca

Dr. Flávio Almeida Amaral

Profa. Daniele da Glória de Souza (Orientadora)

Profa. Maria Aparecida de Resende Stoianoff
SubCoordenadora

AGRADECIMENTOS

Engraçada essa coisa de agradecer.

Já li em algum lugar que agradecer é partilhar uma conquista. Não sei se eu concordo. Claro, isso pode estar certo em algum ou vários níveis, mas não é exatamente assim que me sinto. Eu penso que agradecer tem a ver com lembrar, rever e dedicar. Tem a ver com perceber que somos a soma de dunas de experiências e influências. Tem a ver com perceber que somos mais que a soma também. Tem a ver com valorizar todos esses grãos, tem a ver com a percepção de importância, tem a ver com reconhecimento. E aqui eu quero reconhecer algumas pessoas.

Em primeiro lugar, minha família, meu berço e porto seguro. Apoio sem o qual este trabalho e muito do que precedeu não existiria. Agradeço especialmente à minha avó, Neusa Durães Silva, meu avô, Eduardo Osório Cisalpino, e à minha tia, Patrícia Silva Cisalpino, por tudo, por mais do que eu posso conceber. Para estes três, as palavras empalidecem e falham. Não há como reconhecer o suficiente.

E não posso falar em reconhecimento aqui sem me lembrar imediatamente de meus “chefes”, meus orientadores e mentores. Agradeço imensamente à professora Danielle da Glória de Souza, queridíssima Dani Chefa, por acreditar, por guiar, pelo incentivo, por saber estar do lado, mesmo na outra porção do continente. Ao Grande Chefe, professor Mauro Martins Teixeira, pelo exemplo, pelo apoio, pelas excelentes tiradas. Vocês são mais que fundamentais.

Aos caríssimos pares dos Laboratórios de Interação Microorganismo-Hospedeiro e Imunofarmacologia, pois sem mais pares de mãos nossos trabalhos dificilmente atenderiam nossos prazos, sejam eles quais forem. Não só pela ajuda na bancada, mas pelo companheirismo nessa estrada curiosa da ciência e, claro por saberem co-existir com os tipos mais excêntricos, apesar deles mesmos. Um obrigado especial ao time Dengue, Caio, Vivian e Livia. Cheers!

À equipe técnica dos nossos grupos, Gilvânia, Ilma, Frank e Fernanda Rocha. Sem essas moças, as engrenagens da ciência se emperrariam catastróficamente. Obrigado pela dedicação.

E, por fim, os primeiros a serem lembrados, os amigos. Tanto do ICB quanto os do Mundo, por muito mais que vocês mesmos podem suspeitar. À Louis, Angel, Ju e Katita, por emprestarem alguma beleza e doçura ao cotidiano. À Turma do Rock & Gol imunofar (designação que acabo de inventar), pela diversão e camaradagem. Ao

Bê e ao Lenin, formamos um trio fabuloso! Às meninas da Bio, Lôra, Bia, Dani, Ciça, Fafá e Elisa, crescer como biólogos é uma experiência fenomenal com vocês. E aos meus queridos amigos da Longa Trilha, Carlos Eduardo, Pierre, Daniel, Jerônimo, Fred, Gustavo, Danilo e Marco Túlio. Porque o nome de vocês eu cantarei quando eu alcançar a minha Torre.

“All my life through, the new sights of Nature made me rejoice like a child” (Madame Marie Skłodowska Curie, 1910).

“The universe is asymmetric and I am persuaded that life, as it is known to us, is a direct result of the asymmetry of the universe or of its indirect consequences” (Louis Pasteur, 1888).

“Wide experience increases wisdom, provided it’s not sought purely for the stimulation of sensation” (Surak of Vulcan)

RESUMO

A infecção pelo vírus da dengue emergiu como a mais importante arbovirose em áreas tropicais. Durante os casos graves da infecção, ocorre aumento da permeabilidade vascular, hemoconcentração e plaquetopenia. A via metabólica da 5-lipoxigenase é um importante eixo de equilíbrio para os processos inflamatórios e está associada à produção de leucotrienos e lipoxinas. Lipoxina é uma molécula que foi descrita com importantes efeitos anti-inflamatórios e sua sinalização é associada à ativação de SOCS-2. No presente trabalho, nosso objetivo foi avaliar a importância de 5-LO e SOCS-2 em um modelo experimental de infecção pelo Dengue vírus sorotipo 3 (DENV-3). Camundongos selvagens C57BL/6 (WT) e deficientes para 5-LO (5-LO^{-/-}) e para SOCS-2 (SOCS-2^{-/-}) foram infectados intraperitonealmente com 10 PFU do DENV-3. Animais não infectados foram utilizados como controle. Nosso modelo de infecção pelo DENV-3 é seguido de uma forte resposta inflamatória, como avaliada pelos parâmetros clínicos alterados, produção de citocinas/quimiocinas e acúmulo de neutrófilos. Por outro lado, animais 5-LO^{-/-} e SOCS-2^{-/-} (mas principalmente SOCS-2^{-/-}) apresentaram uma resposta inflamatória alterada, com aumento da hemoconcentração e nível reduzido de plaquetas circulantes quando comparados aos controles selvagens, indicando uma resposta agravada frente à infecção. Esses animais também apresentaram um aumento no acúmulo de neutrófilos no pulmão, no baço e no fígado e, de acordo com esse achado, liberação elevada de CXCL1 no soro, baço e fígado. Além disso, animais 5-LO^{-/-} e SOCS-2^{-/-} apresentaram maior liberação de IL-6 e TNFα no baço e no fígado, apesar de quantidades menores de IFNγ em ambos os órgãos. É importante ressaltar que, em todos os parâmetros animais, SOCS-2^{-/-} apresentaram as alterações mais graves e também elevados títulos virais esplênicos e elevada viremia. Assim, nossos resultados sugerem que a lipoxina pode desempenhar um papel protetor em nosso modelo de infecção experimental pelo dengue e que o bloqueio da produção e da sinalização pela lipoxina poderia estar associado a uma doença mais grave, pelo menos em parte pela perda de controle da carga viral. É importante ressaltar também que o papel regulador de SOCS-2 sobre outras moléculas SOCS pode ser de grande importância.

Palavras-chave: microbiologia; dengue; proteínas supressoras da sinalização de citocina; araquidonato 5-lipoxigenase; lipoxinas

ABSTRACT

Dengue virus (DV) has emerged as the most relevant arthropod-borne viral disease in tropical areas, reaching millions of cases worldwide each year. During the viral infection, there is a characteristic development of vascular instability, as increased vascular permeability, elevated haemoconcentration and thrombocytopenia are observed. The five-lipoxygenase (5-LO) pathway, is an important axis of balance for the inflammatory processes. The 5-LO pathway is associated with production of both leukotrienes and Lipoxins. Lipoxin is a molecule that have been described with important anti-inflammatory effects and its signaling is associated with SOCS-2 activation. Here, our aim was to evaluate the importance of 5-LO and SOCS-2 in an experimental model of Dengue virus serotype 3 (DEN-3) infection. C57 BL/6 wild type, 5-LO deficient (5-LO^{-/-}) and SOCS-2 deficient (SOCS-2^{-/-}) mice were infected intraperitoneally with 10 PFU of DEN-3. Non-infected mice were used as controls. Our model of DEN-3 infection is followed by great inflammatory response as assessed by cytokine/chemokine production and neutrophil recruitment and severe circulatory dysfunction. On another hand, 5-LO^{-/-} and SOCS-2^{-/-} (but mainly SOCS-2^{-/-}) mice showed an altered inflammatory response, with elevated haemoconcentration and reduced platelet count when compared to the wild type control, indicating a severe response to the infection. They also displayed elevated splenic, hepatic and pulmonary neutrophil influx, and accordingly higher levels of CXCL1 in the liver, spleen, lungs and serum. Furthermore, 5- LO^{-/-} and SOCS-2^{-/-} showed higher levels of splenic and hepatic IL-6 and TNFa, despite lower levels of IFNg in both organs. SOCS-2^{-/-} mice also displayed greatly elevated splenic viral titers. Then, our results suggest that lipoxin may play a protective role in our dengue infection experimental model and that the blockade in both lipoxin production or lipoxin signaling is associated with more severe disease, at least in part, because of the loss of virus load control. On another hand, the role of SOCS-2 as counter-regulator of another SOCS molecules could be of great importance.

Keywords: microbiology; dengue; supressors of cytokine signalling; 5-lipoxygenase; lipoxins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A partícula viral (A) e a organização do genoma dos flavivirus (B)	18
Figura 2 - Transmissão do vírus da dengue	20
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida do DENV	22
Figura 4 - Distribuição dos sorotipos do Dengue vírus entre os continentes	26
Figura 5 – Gráfico com óbitos por febre hemorrágica do dengue no Brasil em 2009	27
Figura 6 - Modelo de transdução de sinal por citocinas	37
Figura 7 - Proteínas SOCS inibem JAK-STAT por diferentes mecanismos.....	38
Figura 8 - Alterações hematológicas e nos níveis de transaminases hepáticas desencadeadas pela infecção pelo DENV-3 em camundongos WT e 5-LO ^{-/-}	53
Figura 9 - Acúmulo de neutrófilos no baço, fígado e pulmões de animais WT e 5-LO ^{-/-} após a infecção com o DENV-3 e análise histológica de secções do fígado de animais WT e 5-LO ^{-/-}	54
Figura 10 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no baço, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e 5-LO ^{-/-} comparados com animais da mesma linhagem não infectados (NI)	56
Figura 11 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no fígado, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e 5-LO ^{-/-} comparados com animais da mesma linhagem não infectados (NI)	57
Figura 12 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no fígado, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e 5-LO ^{-/-} comparados com animais da mesma linhagem não infectados (NI)	58
Figura 13 - Taxa de letalidade induzida pela infecção de DENV-3 em camundongos WT e 5-LO ^{-/-} e quantificação das unidades formadoras de placas (PFU) após infecção pelo DENV-3 no baço de animais WT e 5-LO ^{-/-}	60
Figura 14 - Expressão do RNA mensageiro para SOCS-2 no baço e no fígado de animais C57BL/6j infectados com o DENV-3	61
Figura 15 - Alterações hematológicas e nos níveis de transaminases hepáticas desencadeadas pela infecção pelo DENV-3 em camundongos WT e SOCS-2 ^{-/-}	63
Figura 16 - Acúmulo de neutrófilos no baço, fígado e pulmões de animais WT e SOCS-2 ^{-/-} após infecção com o DENV-3 e análise histológica de secções do fígado de animais WT e SOCS-2 ^{-/-}	64
Figura 17 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no baço, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e SOCS-2 ^{-/-}	65
Figura 18 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no baço, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e SOCS-2 ^{-/-}	66
Figura 19 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no soro, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e SOCS-2 ^{-/-}	67
Figura 20 - Taxa de letalidade induzida pela infecção de DENV-3 em camundongos WT e SOCS-2 ^{-/-} e quantificação das unidades formadoras de placas (PFU) após infecção pelo DENV-3 no baço e no sangue de animais WT e SOCS-2 ^{-/-}	69
Figura 21 - Expressão do RNA mensageiro para SOCS-1 e SOCS-3 no baço sw animais WT e SOCS-2 ^{-/-} infectados com o DENV-3.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg/mL	Micrograma por mililitro – unidade de medida de concentração
µL	Microlitro – unidade de volume
12-LO	12-lipoxigenase
15-LO	15-lipoxigenase
18S	Proteína ribossomal de 18kDa
5-LO	5-lipoxigenase
ALX	Receptor acoplado a proteína g específico para lipoxina A4
ATL	<i>Aspirin triggered lipoxins</i> – Lipoxinas induzidas por aspirina
BLT1	Receptor de leucotrieno, isoforma 1
BLT2	Receptor de leucotrieno, isoforma 2
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> – Albumina de soro bovino
C	Proteína Estrutural do Dengue vírus, Cerne (do inglês <i>Core</i>)
CCL2 (MCP-1)	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> – Proteína quimioatraente de monócitos 1
CD ()	<i>Cluster of differentiation</i> ()
cm	Centímetro – unidade de comprimento
°C	Grau Celsius – escala de medida de temperatura
CO ₂	Dióxido de carbono
CXCL1 (KC)	<i>Keratinocyte chemokine</i> – Quimiocina de queratinócito
DC	<i>Dendritic cells</i> – células dendríticas
DC-SIGN	<i>Dendritic cell - specific intracellular adhesion molecule 3 - grabbing nonintegrin</i>
DEN-2	Vírus da dengue sorotipo 2
DEPC	Dietanolamina de pirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP's	Deoxi nucleotídeos tri-fosfatados
DV	Vírus da dengue (Dengue Virus)
E	Proteína Estrutural do Dengue vírus, Envelope (homônimo em inglês)
EDTA	<i>EthyleneDiamineTetracetic acid</i> - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
Fcγ	Porção Fc <i>gamma</i> da molécula de imunoglobulina
FD	Febre do dengue
FHD	Febre hemorrágica do dengue
FLAP	Proteína ativadora da 5-lipoxigenase
FPR	Receptor de peptídeo formilado
g	Grama – unidade de massa
GPCRs	Receptores de sete domínios transmembrana acoplados à proteína G
GRP78/BiP	<i>Glucose-Regulated Protein, 78kDa/ immunoglobulin heavy chain-Binding Protein</i>
h	Hora – unidade de tempo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HETE	Ácido hidroxi-eicosatetraenóico

HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HPETE	Ácido hidroperoxi-eicosatetraenóico
HPRT	Hipoxantil Ribosil Transferase
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
HTAB	<i>Hexadecyl trimethyl ammonium bromide</i>
ICAM-3	<i>Intercellular adhesion molecule - 3</i>
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gamma
IgM	Imunoglobulina tipo M
IL- ()	Interleucina - ()
JAK	<i>Janus kinase</i>
kDa	Kilo Dalton – unidade de massa molecular
KI	<i>Kallicrein unit</i>
L-SIGN	<i>Liver/lymph node- specific ICAM-3-grabbing nonintegrin</i>
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Cisteinil leucotrieno C4
LTD4	Cisteinil leucotrieno D4
LTE4	Cisteinil leucotrieno E4
LX	Lipoxinas
LXA4	Lipoxina A4
M	Molar – unidade de medida de concentração
min	Minutos – unidade de tempo
mL	Mililitro – unidade de volume
mm ²	Milímetro quadrado – unidade de área
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MPO	Myeloperoxidase
MR	<i>Mannose Receptor</i>
n	Número de repetições
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaPO ₄	Fosfato de sódio
Nd	Não detectável
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanômetro – unidade de comprimento
NO	<i>Nitric oxide</i> – Óxido nítrico
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i> – Óxido nítrico sintase
NS1	Proteína não estrutural do Dengue vírus, número 1 (do inglês <i>Non-Structural 1</i>)
NS2a	Proteína não estrutural do Dengue vírus, número 2a (do inglês <i>Non-Structural 2a</i>)
NS2b	Proteína não estrutural do Dengue vírus, número 2b (do inglês <i>Non-Structural 2b</i>)
NS3	Proteína não estrutural do Dengue vírus, número 3 (do inglês <i>Non-Structural 3</i>)
NS4a	Proteína não estrutural do Dengue vírus, número 4a (do inglês <i>Non-Structural 4a</i>)
NS4b	Proteína não estrutural do Dengue vírus, número 4b (do inglês <i>Non-Structural 4b</i>)

	<i>Non-Structural 4b)</i>
NS5	Proteína não estrutural do Dengue vírus, número 5 (do inglês <i>Non-Structural 5)</i>
OD	<i>Optical density</i>
OPD	<i>O-phenylenediamine dihydrochloride</i>
p/v	Peso por volume – unidade de medida de concentração
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PFU	<i>Plaque-forming unit</i> – Unidade formadora de placas
pg	Picograma – unidade de massa
PGE2	Prostaglandina E2
PGH2	Prostaglandina H2
PKR	<i>Protein kinase regulated by double-stranded RNA</i>
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
pM	Picomolar – unidade de concentração
prM	Proteína Estrutural do Dengue virus, pré-Membrana (do inglês <i>pre-Membrane)</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
SCD	Síndrome de Choque do Dengue
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SOCS-()	<i>Suppressor of Cytokine Signalling ()</i>
STAT()	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription ()</i>
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alfa</i> – Fator de necrose tumoral alfa
TP1/2	Receptor acoplado à proteína g específico de TXA ₂ , isoforma 1 ou 2
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXB ₂	Tromboxano B ₂
U/mL	Unidade por mililitro – unidade de medida de concentração
Veic	Veículo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 OS VÍRUS, A FAMÍLIA <i>FLAVIVIRIDAE</i> E A BIOLOGIA DO DENGUE VIRUS	15
1.2 EPIDEMIOLOGIA, MANIFESTAÇÕES DA DOENÇA E MODELOS EXPERIMENTAIS	25
1.3 IMUNOPATOGENESE, LIPOXINAS E SOCS	29
2 JUSTIFICATIVA	40
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 METODOLOGIA.....	42
4.1 VÍRUS.....	42
4.1.1 Titulação do vírus da Dengue.....	43
4.1.2 RT-PCR – Reação da cadeia de polimerase por transcrição reversa Extração do RNA	43
4.1.3 Quantificação do RNA	44
4.1.4 Preparo do cDNA por Transcrição Reversa	44
4.1.5 PCR específica	45
4.2 ANIMAIS	46
4.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS	47
4.4 DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE (MPO).....	48
4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE PLAQUETAS CIRCULANTES	49
4.6 ANÁLISES DO ÍNDICE DE HEMATÓCRITO.....	49
4.7 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	50
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
4.9 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	51
5 RESULTADOS	52
5.1 ANIMAIS 5-LO ^{-/-} NÃO APRESENTAM MUDANÇAS SIGNIFICATIVAS NO QUADRO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO DENGUE.....	52
5.2 ANIMAIS 5-LO ^{-/-} NÃO APRESENTARAM DIFERENÇAS MARCANTES NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS CARACTERÍSTICAS NA RESPOSTA CONTRA O DENV-3.	54
5.3 ANIMAIS 5-LO ^{-/-} APRESENTAM DIFERENÇAS NA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NOS TECIDOS, MAS NÃO NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO HEPÁTICO.	54
5.4 ANIMAIS 5-LO ^{-/-} NÃO APRESENTARAM DIFERENÇAS MARCANTES NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS CARACTERÍSTICAS NA RESPOSTA CONTRA O DENV-3.	55
5.5 NÃO HOUE DIFERENÇAS NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS 5-LO ^{-/-}	

EM RELAÇÃO AOS ANIMAIS WT E TAMPOUCO NA CARGA VIRAL ESPLÊNICA DESSES ANIMAIS.....	59
5.6 A INFECÇÃO PELO DENV-3 PROVOCA AUMENTO DA EXPRESSÃO DO MRNA PARA SOCS-2 NO BAÇO E NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS.....	61
5.7 ANIMAIS DEFICIENTES NA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA SOCS-2 APRESENTAM UM AGRAVAMENTO NO QUADRO CLÍNICO EM RESPOSTA À INFECÇÃO PELO DENV-3, QUANDO COMPARADOS AOS ANIMAIS WT.....	62
5.8 ANIMAIS SOCS-2 ^{-/-} APRESENTAM MARCANTES DIFERENÇAS NA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NOS TECIDOS, E AGRAVADO DANO HEPÁTICO.....	64
5.9 ANIMAIS SOCS-2 ^{-/-} APRESENTAM AUMENTO MARCANTE NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS CARACTERÍSTICAS NA RESPOSTA DENV-3.....	65
5.10 ANIMAIS SOCS-2 ^{-/-} APRESENTAM UMA TAXA DE LETALIDADE MAIOR QUANDO COMPARADOS AOS ANIMAIS WT, ALÉM DE VIREMIA ELEVADA E TÍTULOS VIRAIS ESPLÊNICOS.....	68
5.11 A INFECÇÃO PELO DENV-3 INDUZ A EXPRESSÃO DE SOCS-1 E SOCS-3 NO BAÇO DOS ANIMAIS INFECTADOS. NA AUSÊNCIA DE SOCS-2, A QUANTIDADE DE TRANSCRITO PARA SOCS-1 E SOCS-3 AUMENTA EXPONENCIALMENTE NO TECIDO EM QUESTÃO.....	70
6 DISCUSSÃO.....	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 OS VÍRUS, A FAMÍLIA *FLAVIVIRIDAE* E A BIOLOGIA DO DENGUE VIRUS

Vírus.

Do latim, veneno. Essa foi a palavra designada para representar o grupo das menores entidades biológicas funcionais conhecidas no nosso planeta. Os vírus são seres acelulares, compostos por genomas de RNA ou DNA num envoltório protéico, podendo apresentar também um componente de membrana lipídica. Mal suspeitava Dmitri Ivanovski, da vastidão e complexidade do mundo nanoscópico, o qual ele abria as portas em 1882, ao descrever o *contagium vivum fluidum*, onde os extratos de folhas de plantas infectadas pela doença do mosaico continuavam infectantes após filtragem em filtros de cerâmica, com poros menores do que bactérias. Algum tempo depois, em 1935, Wendell Stanley tornou possível apreciar a natureza desses outrora ditos *agentes filtráveis* com o advento da microscopia eletrônica e, na mesma década, Ernest Goodpasture cultivou com sucesso *influenza* e diversos outros vírus em ovos de galinha fertilizados (Magner, 2009). Até hoje, mais de 3.000 espécies de vírus foram descobertas. E o número continua crescendo.

A primeira doença humana associada a um vírus foi a febre amarela (Chambers *et al.*, 1990). Diferentemente do observado para outros microrganismos, os vírus são agentes infecciosos que necessitam da maquinaria bioquímica celular do hospedeiro para sua replicação, sendo, portanto, classificados como parasitas intracelulares obrigatórios. São constituídos no geral por um genoma de ácido nucléico (desoxirribonucleico) (DNA) ou ribonucleico (RNA); empacotados em uma estrutura de constituição protéica (capsídeo) podendo ainda apresentar uma membrana externa de origem protéica ou lipídica denominada envelope. O vírion ainda pode conter enzimas essenciais e/ou acessórias, além de outras proteínas (Fields *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2006). Os vírus são capazes de infectar uma grande variedade de populações celulares utilizando as moléculas fisiológicas da superfície celular como receptores para permitir sua adsorção às células alvo. A replicação viral interfere com a síntese e função das proteínas celulares normais e leva à lesão, e pode levar, por fim, à morte da célula infectada (Fields *et al.*, 2006).

Dentre os diversos táxons de vírus conhecidos na atualidade, os membros da família Flaviviridae representam um importante grupo de vírus envelopados cujo

genoma é constituído por RNA de fita simples positivo. Desempenham importante impacto global na saúde pública em função de sua ampla distribuição mundial e de sua grande habilidade de causar significativa morbi-mortalidade em humanos. O gênero contém mais de 70 espécies já identificadas, e destas, aproximadamente a metade é capaz de causar doença em humanos. A maioria dos flavivírus é transmitida aos humanos através da picada de mosquitos ou carrapatos, contudo ainda existem espécies sem vetor conhecido (Chambers *et al.*, 1990; Mackenzie *et al.*, 2004; Gould; Solomon, 2008; Pierson; Diamond, 2008).

As infecções causadas pelos flavivírus resultam em manifestações clínicas que variam desde uma doença febril branda até as formas mais graves como a encefalite e a doença hemorrágica. Vários são os representantes deste grupo que incluem: o vírus da febre amarela, os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV 1-4), o vírus da encefalite japonesa, o vírus da encefalite do oeste do Nilo, o vírus da encefalite de Powassan e o vírus da encefalite de St. Louis, entre outros. Dentre estes, os DENV 1-4 e o vírus da encefalite do oeste do Nilo são considerados emergentes ou re-emergentes, dado que, nas últimas décadas, a incidência de doença humana causada por eles tem aumentado em uma taxa alarmante (Chambers *et al.*, 1990; Pierson; Diamond, 2008).

O vírus da dengue ou *Dengue virus* (DENV) é o agente etiológico da mais prevalente arbovirose contemporânea (Shrestha *et al.*, 2004a; Kyle; Harris, 2008). A dengue é associada com inúmeras epidemias urbanas e é hoje a maior ameaça de saúde pública em desenvolvimento no mundo. Não obstante, no momento, não existem tratamentos específicos ou vacina disponível para essa doença, e é considerada uma doença tropical negligenciada (Holmes; Twiddy, 2003; Shrestha *et al.*, 2004a; Pang *et al.*, 2007; Kyle; Harris, 2008).

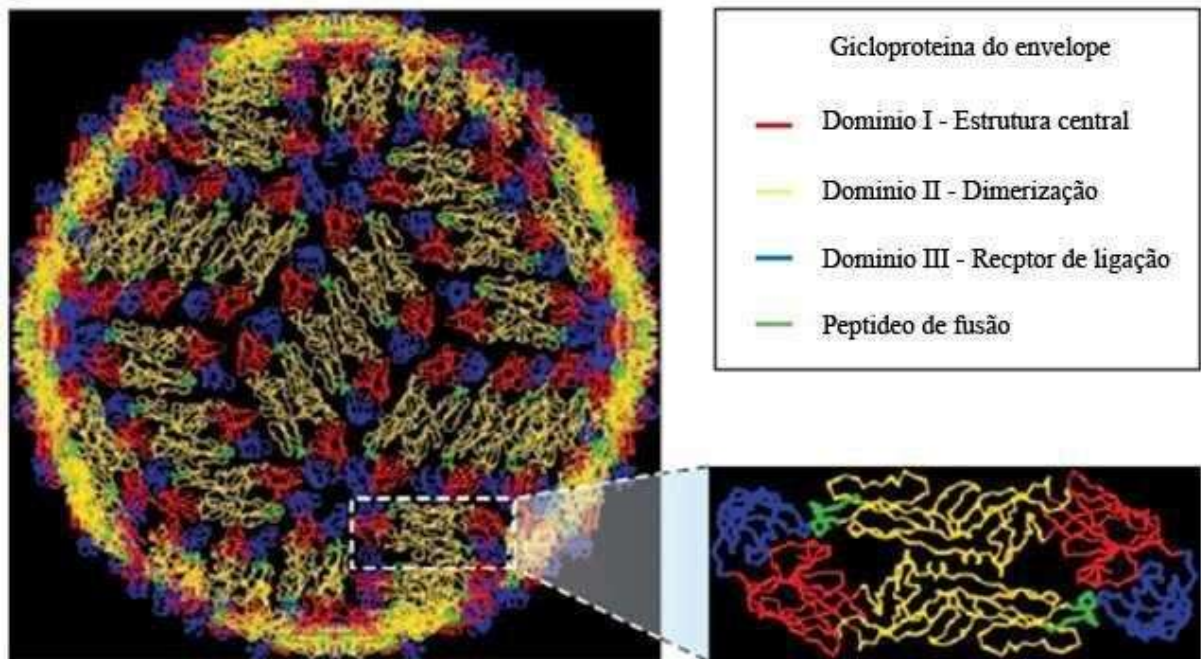
Os DENV pertencem à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*. Como todos os outros flavivirus, apresentam um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo envolto por um capsídeo icosaédrico e recoberto por um envelope lipídico (Chambers *et al.*, 1990; Ligon, 2004). Apresentando aproximadamente 62-67% de homologia nas sequências de aminoácidos, os quatro vírus da dengue foram classificados em quatro sorotipos distintos (DEN1-4). Essa denominação faz referência à ordem de descoberta dos mesmos (Holmes; Twiddy, 2003; Ligon, 2004).

É estimado, através da utilização de técnicas de relógio molecular, que o progenitor comum dos sorogrupos de DENV tenha surgido há aproximadamente

1.000 anos e estudos filogenéticos mostram que o sorotipo 4 é o mais divergente entre os quatro, seguido pelo DENV-2, e pelos demais, DENV-1 e DENV-3. Baseado nas sequências completas do gene do envelope (E) ou do limite envelope-proteína não-estrutural 1 (E-NS1) fazendo uso de um corte de 6% de divergência, o DENV1 é frequentemente dividido em quatro ou cinco genótipos, incluindo o clado selvagem. O DENV2 é dividido em seis subtipos designados como: Selvagem, Americano, Cosmopolita, Asiático 1, Asiático 2, e Asiático-Americano, de modo que os três últimos podem ser considerados como um único genótipo (Asiático). Já o DENV3 tem sido dividido em quatro genótipos (I-IV), às vezes, incluindo um quinto (V). E, finalmente, o DENV4 dividido em dois genótipos endêmicos (I-II) e um selvagem (Holmes; Twiddy, 2003; Kyle; Harris, 2008). O número de genótipos provavelmente reflete a soma de mudança evolutiva, no qual em parte reflete a quantidade de transmissão de cada sorotipo (Mackenzie *et al.*, 2004).

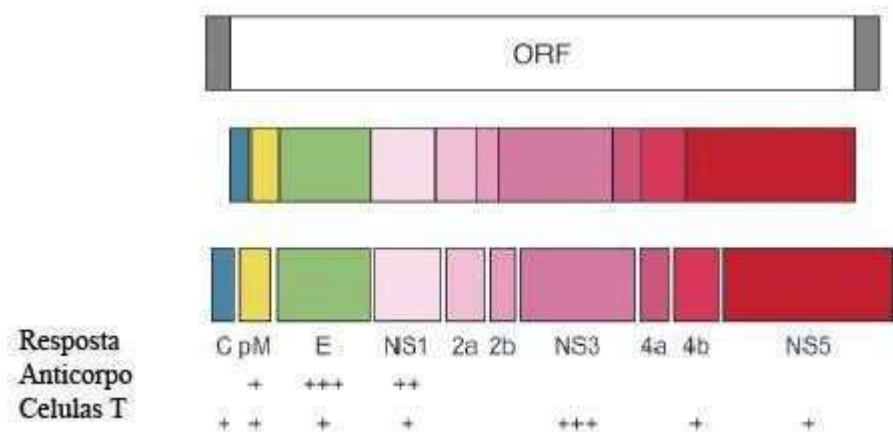
Muitos estudos têm sustentado a teoria de que alguns sorotipos apresentam maior potencial patogênico que outros. Balmaseda *et al.* (2006) relataram que DENV2 têm sido mais comumente associado ao desenvolvimento de doença grave seguido pelos DENV1 e DENV3. Já Nisalak *et al.* (2003) relataram que o DENV4 aparece como o sorotipo relacionado à sintomatologia mais branda, todavia também é capaz de gerar doença grave em alguns casos. Esses autores mencionam que os sorotipos DENV2 e DENV4 têm sido associados ao aumento da gravidade da doença durante infecções secundárias, enquanto que os sorotipos DENV1 e DENV3 estão mais relacionados ao desenvolvimento de doença grave em infecções primárias (Kyle; Harris, 2008). Além disso, em geral, acredita-se que os genótipos Asiáticos parecem ser mais virulentos que os genótipos inicialmente encontrados nas Américas e no Sul do Pacífico (Clyde *et al.*, 2006).

Figura 1 - A partícula viral (A) e a organização do genoma dos flavivirus (B)



A) A partícula viral. O vírion dos DENV é esférico e envelopado com um diâmetro de aproximadamente 50 nm. Ele contém três proteínas estruturais (C – capsídeo, M – membrana e E – envelope) e o genoma de RNA. A glicoproteína E é composta por três domínios: Domínio I – estrutura central, o domínio II que apresenta o peptídeo de fusão e o domínio III, que contém o receptor de ligação.

Fonte: adaptada da versão original publicada em *Nature Microbiology Reviews* (2007)



B) Organização do genoma dos flavivirus, suas proteínas resultantes e a localização dos maiores alvos da resposta imune. O genoma dos DENV é composto por uma fita simples de RNA sentido positivo com uma *open reading frame* (ORF). A ORF é traduzida em uma poliproteína única, que é clivada por proteases virais e do hospedeiro, resultando em 10 proteínas virais: a proteína C, a proteína M (sintetizada como um precursor maior, a prM), e a maior proteína estrutural, a glicoproteína E. Além disso, há sete proteínas não-estruturais envolvidas na replicação viral, entre outras funções. A intensidade das respostas dos anticorpos e das células T às proteínas virais individuais é indicada acima.

Fonte: adaptada de Rothman (2004).

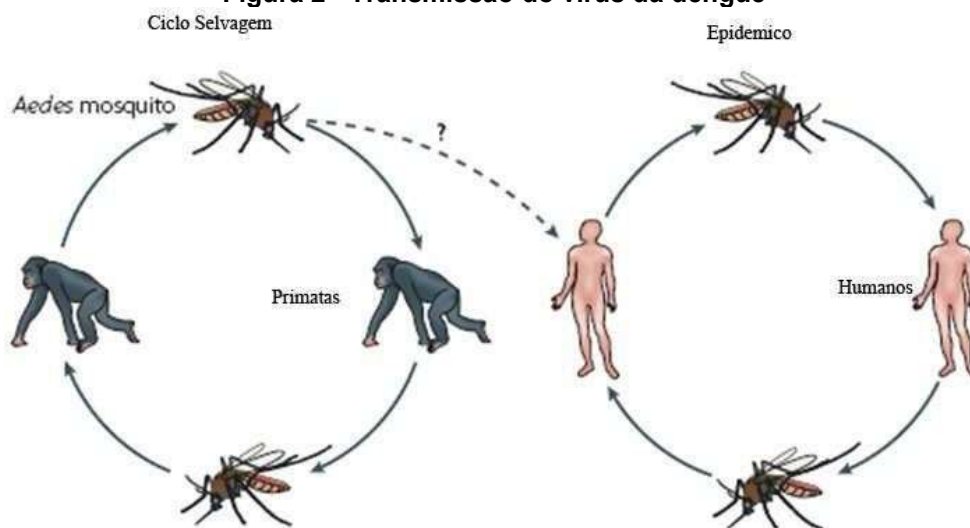
Os DENV são transmitidos aos humanos através da picada do mosquito vetor infectado. O *Aedes aegypti*, um mosquito altamente domesticado, é de longe o vetor

predominante dos DENV; contudo, outras espécies, como o *Aedes albopictus* e o *Aedes polynesienses*, também são capazes de sustentar essa transmissão. Os DENV podem ser transmitidos verticalmente da fêmea infectada para a sua prole; no entanto, muitos mosquitos tornam-se infectados quando ingerem sangue virêmico de um indivíduo no estado agudo da infecção.

Os DENV são um dos únicos arbovírus que não necessitam de um ciclo selvagem para a manutenção da transmissão epidêmica em humanos. Em particular, a manutenção do vírus é garantida por um ciclo de transmissão humano-mosquito-humano. Embora um ciclo de transmissão selvagem possa existir nas florestas da Ásia e no oeste da África entre primatas não-humanos e os mosquitos *Aedes*, a contribuição desse ciclo selvagem para a transmissão epidêmica urbana é relatada como não significativa (Monath, 1994; Whitehead *et al.*, 2007).

Detalhadamente, o ciclo de transmissão do DV tem início com a picada da fêmea do mosquito em um hospedeiro contaminado, onde o vírus presente na circulação é ingerido pelo artrópode (Whitehead *et al.*, 2007). Uma vez dentro do mosquito, o vírus se multiplica no intestino médio e, após algum tempo, são encontrados vírions também no ovário, sistema nervoso e nas glândulas salivares, local por onde o vírus é passível de transmissão. Este período de incubação tem duração de 10-14 dias. Uma vez presente na circulação sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado, o vírus passa a se multiplicar em células permissivas de órgãos específicos, como o baço, fígado e tecidos linfáticos (Whitehead *et al.*, 2007). Ambos os ciclos são representados na Figura 2 a seguir.

Figura 2 - Transmissão do vírus da dengue



Transmissão dos DENV. Devido aos elevados níveis de viremia resultantes da infecção pelos DENV em humanos, os vírus são eficientemente transmitidos entre mosquitos e humanos sem a necessidade de um hospedeiro selvagem para a amplificação. A dispersão dos DENV é realizada principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*, que se reproduz em recipientes de água domésticos e peridomésticos, aumentando a frequência de contato entre os mosquitos e humanos. Além disso, um ciclo selvagem para a transmissão da dengue foi documentado no oeste da África e no sudeste da Ásia.

Fonte: modificada da versão original publicada por Whitehead (2007).

O vírus da Dengue demonstra tropismo por um amplo espectro de células humanas, e o principal alvo da infecção ainda é motivo de controvérsia (Clyde *et al.*, 2006). Embora haja um consenso geral de que as células da linhagem fagocítica mononuclear, células dendríticas (DCs) e células de Langerhans (monócitos/macrófagos) são os alvos primários (Tassaneetrithep *et al.*, 2003; Clyde *et al.*, 2006), evidências indicam que o vírus também é capaz de infectar linfócitos B, linfócitos T, células Natural Killer, células endoteliais, hepatócitos e neurônios (Clyde *et al.*, 2006).

O ciclo de replicação do DENV inicia-se com a ligação do vírion e sua entrada na célula hospedeira pelo processo de endocitose mediada por receptor. Vários receptores celulares distintos são candidatos a mediadores da adsorção viral, incluindo sulfato de heparana (Chen *et al.*, 1997; Germi *et al.*, 2002), *heat shock proteins* (Hsp)-70 e Hsp-90 (Valle *et al.*, 2005), GRP78/BiP (Jindadamrongwech *et al.*, 2004), CD14 (Chen *et al.*, 1999), bem como DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3(ICAM-3)-grabbing nonintegrin*) (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Tassaneetrithep *et al.*, 2003; Lozach *et al.*, 2005), L-SIGN (*liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*) (Tassaneetrithep *et al.*, 2003) e o receptor de manose (MR, *mannose receptor*) (Miller *et al.*, 2008).

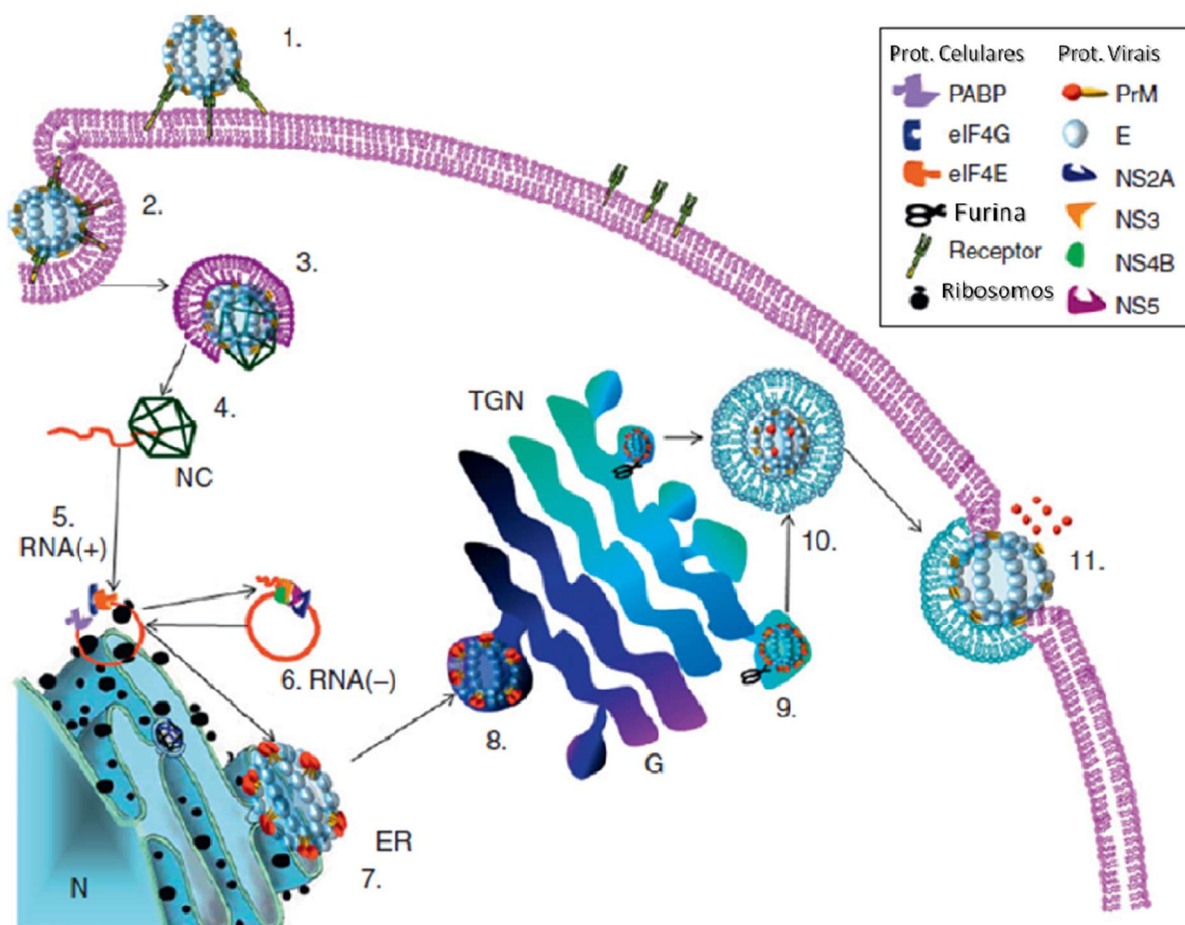
Existem evidências consideráveis sugerindo que o primeiro passo numa infecção primária pelo DENV seria a ligação da glicoproteína viral E, a qual está presente na superfície

de partículas virais maduras como homodímeros, a receptores na superfície de células permissivas (Figura 3, passo 1). A proteína E consiste de três domínios. O domínio I está presente na região N-terminal e garante organização estrutural. O domínio II, ou domínio central, está envolvido na dimerização e contém uma alça hidrofóbica de fusão essencial à fusão da proteína E com a membrana celular. O domínio III, situado na região C-terminal, é tido como o domínio de reconhecimento pelo receptor e possui uma dobra semelhante à imunoglobulina ou “*immunoglobulin-like fold*” (Chin *et al.*, 2007; Huerta-Zepeda *et al.*, 2008). A interação da proteína E com o(s) receptor(es) leva a uma série de eventos tanto na partícula viral quanto na membrana e no citoesqueleto da célula-alvo, permitindo assim a entrada do vírus.

Dois tipos de receptores parecem desempenhar um papel na facilitação da entrada do DENV na célula do hospedeiro, dependendo do tipo de célula-alvo (Huerta-Zepeda *et al.*, 2008). O primeiro tipo parece ser composto por receptores de baixa afinidade e especificidade, incluindo moléculas de adesão do tipo aminoglicanas, como o sulfato de heparana, expresso em uma ampla variedade de tipos celulares (Germi *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002). O segundo tipo de receptor corresponde a receptores semelhantes a lectina (*lectin-like*), como o DC-SIGN e o MR, expressos em algumas células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas imaturas, monócitos e macrófagos (Lozach *et al.*, 2005; Tassaneetrithep *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2008).

Presumivelmente, essas moléculas concentram as partículas virais na superfície celular e facilitam o reconhecimento pelos receptores do segundo tipo, como as proteínas do choque térmico (*heat shock proteins* – HSP 70 e HSP 90). Essa interação, por sua vez, induz a formação de endossomas, fenômeno conhecido como “endocitose mediada por receptor”, conforme mostrado na Figura 3, passo 2, que permite a entrada do vírus na célula hospedeira (Lozach *et al.*, 2005; Tassaneetrithep *et al.*, 2003; Reyes-Del Valle *et al.*, 2005; Huerta-Zepeda *et al.*, 2008). No entanto, o papel das HSP 70 e 90 como receptores para o DENV ainda é motivo de debate e pode depender do tipo celular que está sendo examinado (Cabrera-Hernandez *et al.*, 2007; Chavez-Salinas *et al.*, 2008; Reyes-Del Valle *et al.*, 2005). Ambas as HSP estão associadas a microdomínios de membrana, cuja interação é crucial para a entrada do DENV. Além disso, as HSP 70/90 também parecem estar envolvidas na entrada de outros flavivírus (Lin *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2007) e do vírus da hepatite E (Zheng *et al.*, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida do DENV



A proteína E é o principal componente da superfície viral. **Passo 1 – Ligação:** O passo inicial do ciclo viral, é a ligação da proteína E a um receptor da superfície celular (formando um complexo de fusão) tal como o sulfato de heparana, lectinas tipo-C manose-específicas entre outros citados no texto, porém um receptor específico para a internalização do vírus nas células hospedeiras ainda não foi identificado. **Passo 2 – Endocitose:** Após ligação ao receptor, o vírus é internalizado nas células através do processo de endocitose mediado por clathrina e as partículas virais são transportadas para endossomos. **Passo 3 - Fusão das membranas:** No citoplasma, acidificação da luz do endossomo induz mudanças estruturais na proteína E e promove a fusão entre a partícula viral e a membrana do endossomo. **Passo 4 – Desnudamento:** Um poro de fusão é formado e o nucleocapsídeo (NC) é levado ao citoplasma e o RNA viral (em laranja) é liberado do NC no citoplasma. **Passo 5 – Tradução:** O RNA viral de sentido positivo (RNA(+)) é diretamente traduzido numa única poliproteína ancorada ao retículo endoplasmático (ER). A estrutura do cap 5' do RNAm viral promove a montagem de fatores eucarióticos de iniciação (eIFs) tais como eIF4E e eIF4G causando o recrutamento de ribossomos para o RNAm viral. Ainda, mesmo na ausência de uma cauda poliadenilada, a proteína ligante à poli(A) (PABP) interage com a região 3' não traduzida (3' UTR), sugerindo que o genoma viral é circularizado através de interação PABP-eIF4G. A poliproteína é então processada por proteases virais e celulares em três (e posteriormente 4) proteínas estruturais e sete proteínas não- estruturais (NS, algumas em destaque). **Passo 6 – Replicação:** As proteínas NS (em destaque na figura) ativamente replicam o RNA(+) viral em complexos de replicação associados às membranas celulares, produzindo assim cópias de sentido negativo, RNA(-), que por sua vez são utilizadas como moldes para produção de mais RNA(+), que dessa vez servirá como RNA genômico de novas partículas. **Passo 7 – Montagem:** Após a tradução e replicação do RNA, a montagem do vírus começa quando uma cópia do RNA interage com diversas cópias da proteína C, formando nucleocapsídeos que são por sua vez envelopados pelo heterodímero PrM-E, que formaram partículas imaturas que vão então brotar no lúmen do retículo endoplasmático rugoso. **Passos 8 e 9 – Maturação:** Partículas virais transitam através do aparelho de Golgi (G) e da rede trans-Golgi (TGN) onde a PrM é clivada pela proteína celular furina, resultando em partículas contendo

as proteínas Pr, M e E. *Passos 10 e 11 – Exocitose e liberação*: A partícula madura do vírus migra para a membrana celular e é liberada da célula, juntamente com a proteína Pr resultante da maturação.

Fonte: adaptada de Urcuqui-Inchima *et al.* (2010).

Algumas proteínas conhecidas, como a GRP78, são consideradas parte do complexo de entrada do DENV, mas suas funções permanecem elusivas (Cabrera-Hernandez *et al.*, 2007). As associações entre a proteína E e proteínas adaptadoras podem ser designadas como “complexos de fusão”. A presença de *lipid rafts* ou “poços cobertos” na formação desses complexos indica que a formação de vesículas depende de colesterol (em células humanas) ou clatrina (em células de mosquitos) (Acosta *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Van der Schaar *et al.*, 2008). Em conjunto, esses resultados evidenciam que, independentemente do receptor utilizado, pelo menos dois mecanismos de entrada de flavivírus em células de artrópodes ou mamíferos existem: a entrada viral pode ocorrer por fusão direta do vírus com a membrana celular ou por endocitose mediada por clatrina (Chu; Ng, 2004; Chu *et al.*, 2006; Hase *et al.*, 1989a; Hase *et al.*, 1989b; Krishnan *et al.*, 2007; Lim; Ng, 1999; Se-Thoe *et al.*, 2000; Suksanpaisan *et al.*, 2009).

Outra via de entrada do vírus ocorre por meio do fenômeno conhecido como ADE (*Antibody-Dependent Enhancement* ou intensificação mediada por anticorpo), no qual a ligação de anticorpos sub-neutralizantes à partícula viral facilita a entrada do vírus através da interação com receptores da porção Fc (FcγR). No entanto, discutiremos esse fenômeno mais adiante, devido à sua associação com formas graves da infecção.

Após a internalização do vírus (Figura 3, passo 2), o endossoma primário inicia gradualmente um processo de acidificação. Quando atinge um pH entre 6.2-6.4, ocorre a dissociação dos homodímeros da proteína E, permitindo que a alça de fusão presente em cada monômero se ancore à membrana endossomal. Esse evento catalisa a formação de homotrímeros da proteína E (HEINZ *et al.*, 2004). A associação trimérica induz uma dobra na membrana endossomal, promovendo a formação de uma ponte, também chamada de pedúnculo de hemifusão, entre o envelope viral e a membrana do endossomo, resultando na fusão (Figura 3, passo 3). Com esse evento, o nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma (Figura 3, passo 4). Os mecanismos da liberação do nucleocapsídeo permanecem pouco esclarecidos. Após o desnudamento (Figura 3, passos 3 e 4), o genoma viral é preparado para a tradução pelo maquinário da célula hospedeira.

Uma vez liberado de suas proteínas estruturais, o genoma do DENV torna-se acessível para realizar suas três funções principais. Primeiramente, ele atua como RNAm para a síntese da poliproteína viral (tradução). Em segundo lugar, serve como molde para a síntese de mais fitas de RNA, sendo os primeiros moldes negativos que serão utilizados na formação de RNA genômicos de sentido positivo. Por fim, atua como genoma para ser incorporado a novas partículas virais. É crucial destacar que o processo de tradução do genoma do DENV está acoplado à replicação. Isso ocorre, porque o genoma viral precisa ser traduzido para a síntese das proteínas não-estruturais, as quais desempenham papel fundamental na replicação do RNA (Harris *et al.*, 2006).

A tradução do genoma RNA(+) do DENV resulta na produção de uma única poliproteína ancorada ao retículo endoplasmático (Figura 3, passo 5). A síntese da poliproteína viral tem início no códon AUG próximo à região 5' no RNA. A estrutura de cap 5' presente no RNA viral facilita a montagem e o recrutamento de fatores eucarióticos de iniciação (eIFs, como eIFE e eIF4G) e de ribossomos. Curiosamente, a proteína ligante a poli(A) (PABP) pode se ligar à região 3' não traduzida (3' UTR), mesmo que o genoma viral não apresente uma cauda poliadenilada. Isso sugere que a circularização do genoma através da interação eIFG4-PABP pode ser necessária para um processo eficiente de tradução (Polacek *et al.*, 2009).

O processo de síntese do RNA(-) (Figura 3, passo 6) não é totalmente compreendido. Algumas evidências sugerem que a replicação, ocorrendo simultaneamente à tradução, pode ocorrer em estruturas membranosas intracelulares cuja origem não está bem definida (Clyde *et al.*, 2006; Miller; Krijnse-Locker, 2008). No entanto, é sabido que, após a tradução, proteínas não-estruturais do vírus, juntamente com fatores do hospedeiro, formam o complexo de replicação responsável pela síntese do RNA(-), complementar ao RNA(+), resultando em um RNA de fita dupla intermediário. O ciclo completo de replicação do RNA do DENV engloba a síntese do RNA(-) e dos novos RNA(+) que atuam tanto como RNAm quanto como RNA genômico para a nova progênie viral.

Após a síntese da poliproteína e a replicação do genoma, o próximo passo crucial para a formação de novas partículas virais é a encapsulação. Embora as primeiras indicações da interação entre o RNA viral e a proteína estrutural C tenham sido demonstradas há mais de uma década (Khromykh *et al.*, 1999), os mecanismos de formação do complexo RNA-proteína C, e consequentemente a formação do

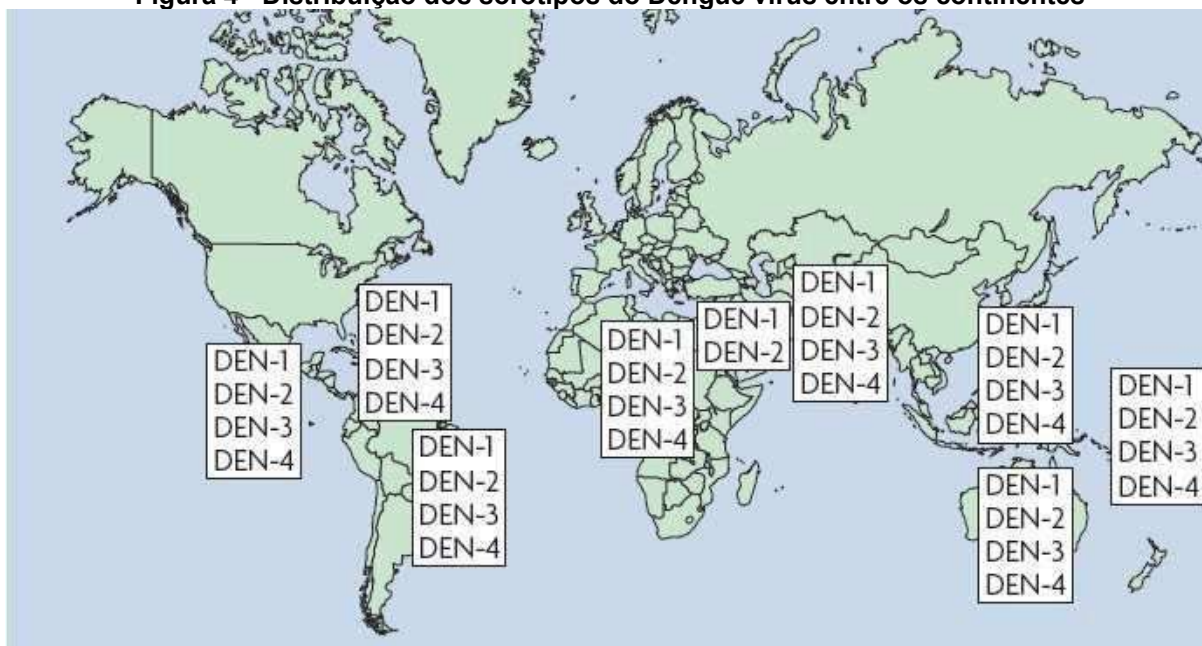
nucleocapsídeo, permanecem obscuros. Fortes evidências (Ma *et al.*, 2004; Samsa *et al.*, 2009; Heaton; Randall, 2010) indicam uma participação significativa de gotículas lipídicas (LD, do inglês, lipid droplets) e estruturas membranosas derivadas do retículo endoplasmático. Assim, as partículas virais parcialmente montadas emergem como brotamentos do lúmen do retículo endoplasmático (Figura 3, passo 7) e são envolvidas por membranas lipídicas que contêm as outras duas proteínas estruturais, prM e E, na forma de heterodímeros prM-E. Esses heterodímeros são incorporados aos vírions imaturos por interação com o nucleocapsídeo (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Durante o processo de egresso da nova progênie viral através das vias secretórias da célula hospedeira, a proteína E presente nos vírions imaturos passa por uma série de mudanças conformacionais reversíveis e dependentes do pH (Figura 3, passo 8). No estágio imaturo, os heterodímeros prM-E são agrupados como trímeros, enquanto em partículas maduras, a proteína E se apresenta em homodímeros. Como mencionado anteriormente, esses homodímeros formam homotrímeros quando o vírus se funde à membrana endossomal durante a entrada. Durante o transporte, as partículas virais atravessam a rede trans-Golgi, onde a proteína prM é clivada pela protease celular furina, um processo essencial para a maturação do DENV (Figura 3, passo 9). No entanto, o segmento pr continua associado ao vírion até que este seja liberado da célula. A retenção do segmento pr evita a ligação prematura da proteína E à membrana exossomal durante o trânsito da partícula pelo ambiente ácido da rede trans-Golgi. Finalmente, as partículas virais maduras e as proteínas pr clivadas são transportadas e liberadas no meio extracelular por exocitose (Figura 3, passos 10 e 11) (Bressanelli *et al.*, 2004; Perera; Kuhn, 2008; Zybert *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2009).

1.2 EPIDEMIOLOGIA, MANIFESTAÇÕES DA DOENÇA E MODELOS EXPERIMENTAIS

Estima-se hoje que cerca de três bilhões de pessoas, distribuídas por mais de 100 países, estão sob o risco de infecção pelo vírus da Dengue (WHO). Por volta de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas a cada ano e, dentre esses casos, 250 a 500 mil pessoas desenvolvem a forma mais grave da doença (WHO).

Figura 4 - Distribuição dos sorotipos do Dengue vírus entre os continentes

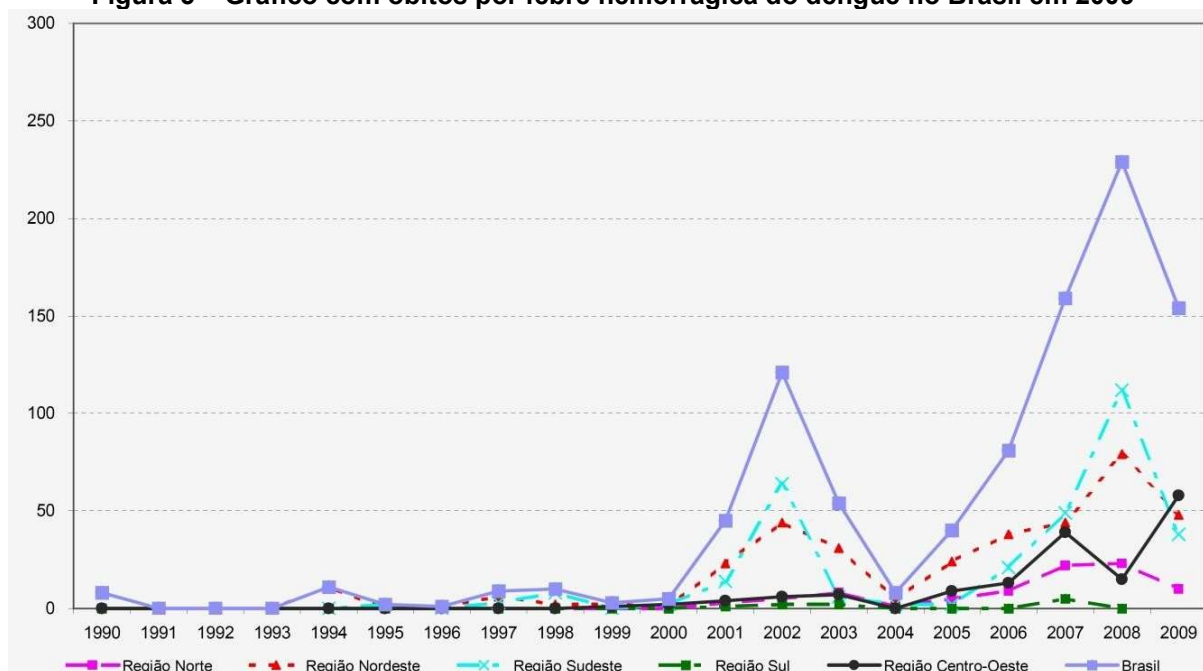


A associação entre a presença de mais de um sorotipo do vírus e a presença de um mosquito vetor, neste caso, o *Aedes aegypti*, é considerada como um fator determinante para o estabelecimento de epidemias em determinadas regiões. A América Latina e o Sudeste Asiático são as áreas mais críticas. Fonte: adaptada de Guzman *et al.* (2010).

Os dados epidemiológicos relacionados à dengue no Brasil são preocupantes e evidenciam a significativa incidência da doença. No ano de 2007, foram registrados 438.949 casos de dengue clássica, 926 casos de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e 98 óbitos. É notável que 68% das notificações de FHD concentraram-se nos estados do Ceará, Rio de Janeiro, Maranhão, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Piauí. Da mesma forma, 50% dos óbitos foram registrados nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Pará e Piauí.

Um aspecto relevante da análise epidemiológica é a expressiva ocorrência dos casos de dengue em municípios com menos de 1.000.000 de habitantes, indicando que a doença não se restringe apenas aos grandes centros urbanos complexos. Além disso, destaca-se o impacto positivo de iniciativas em alguns grandes centros urbanos, como o "Pan Sem Dengue" na região metropolitana do Rio de Janeiro e o Plano de Intensificação Verão 2007 no município de São Paulo, que conseguiram conter a explosão de casos. Os números relativos à epidemia de dengue no Brasil até 2009 mostram um aumento alarmante, destacando a necessidade contínua de esforços e estratégias eficazes para o controle e prevenção da doença (Figura 5).

Figura 5 – Gráfico com óbitos por febre hemorrágica do dengue no Brasil em 2009



Dados obtidos da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) e atualizados em 15/03/2009.

Fonte: adaptada de http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id_area=1498. Acesso em: 2011.

A infecção pelo vírus da Dengue é caracterizada por um amplo espectro de manifestações. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), além das infecções assintomáticas, as infecções pelo vírus da dengue podem ser classificadas em três categorias distintas: febre indiferenciada, febre do dengue (FD) e febre hemorrágica do dengue (FHD) (Deen *et al.*, 2006). A primeira apresenta sintomas semelhantes aos de qualquer síndrome viral. A FD é a forma clássica da infecção e se manifesta como um quadro gripal, caracterizado por febre alta, cefaleia, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, náusea, vômito, diarreia, hipotensão postural, dor abdominal, lombar e membros inferiores. Além disso, podem ocorrer alterações na pele e mucosas, como petéquias. Mesmo sendo a forma clássica, é possível observar manifestações hemorrágicas, como epistaxe, gengivorragia e hemorragia digestiva (Deen *et al.*, 2006). A FHD, forma grave da doença, apresenta inicialmente as mesmas manifestações da forma clássica. Os fenômenos hemorrágicos ocorrem no segundo ou terceiro dia da doença e manifestam-se principalmente na pele e no tubo digestivo, podendo surgir metrorragias, epistaxes, gengivorragia e outros sangramentos (Deen *et al.*, 2006).

Outros eventos característicos da FHD são plaquetopenia e aumento da permeabilidade vascular, evidenciados por hemoconcentração e desenvolvimento de

efusões pleurais. A FHD pode também ser dividida em quatro graus de gravidade, de acordo com a presença ou ausência de sangramento espontâneo e o grau de extravasamento plasmático. A Síndrome de Choque do Dengue (SCD) refere-se aos graus III e IV da FHD, sendo que no primeiro há queda da pressão arterial e choque hipovolêmico moderado, ao passo que no último há choque profundo, com pressão sanguínea não detectável (Deen *et al.*, 2006).

Até o presente momento, não há tratamento específico para a doença causada pelo vírus da dengue. A opção de escolha é o tratamento sintomático apropriado. No entanto, o principal meio de prevenção da dengue é o controle do mosquito vetor, um método dispendioso e geralmente ineficiente, como pode ser comprovado pela expansão do número de casos ocorrida nos últimos anos. O desenvolvimento de tratamentos específicos ou de uma vacina efetiva contra o vírus tem sido considerado uma prioridade, inclusive pela Organização Mundial da Saúde (Rothman, 2003). O desenvolvimento de modelos animais para a infecção pelo vírus é uma abordagem importante para o estudo de potenciais alvos terapêuticos e vacinais.

A maioria dos modelos experimentais atualmente utilizados não reproduz de maneira fidedigna as características da infecção observadas em humanos (Rothman, 2003). Além de não mimetizar as características fisiopatológicas da doença humana, os modelos animais usados frequentemente empregam inóculos com altas cargas virais, o que leva a uma infecção disseminada, aparentemente inconsistente com o que é observado durante a infecção humana (Green; Rothman, 2006). Por fim, tais modelos utilizam animais em idades precoces, muitas vezes com o sistema imune ainda em período de maturação, o que impede a extrapolação das informações obtidas para a infecção em indivíduos adultos, como ocorre na doença humana (Rothman, 2003). Souza e colaboradores (2009) desenvolveram um modelo que reproduz as manifestações observadas nos quadros graves da doença em humanos. Trata-se de um modelo de infecção primária baseado na injeção de um isolado clínico do vírus da dengue adaptado ao hospedeiro murino. A injeção do vírus adaptado é capaz de induzir as principais manifestações características da doença humana, incluindo plaquetopenia e hemoconcentração, muitas vezes com fenômenos hemorrágicos e mortalidade apreciável. Além disso, camundongos infectados com o vírus adaptado desenvolvem dor inflamatória, outro sintoma marcante da patologia humana mais branda. O modelo em questão parece ser uma ferramenta interessante para o estudo da patofisiologia da infecção pelo dengue, e novos estudos têm

elucidado mecanismos importantes envolvidos na progressão da doença através deste modelo (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Assuncao-Miranda *et al.*, 2010).

Existem controvérsias em relação aos mecanismos envolvidos na manifestação da forma hemorrágica da doença, seja durante uma infecção primária ou secundária. Hipóteses contrastantes têm atribuído a gravidade da doença a fatores virais e do hospedeiro (Rosen, 1977; Halstead, 1989; Rothman, 2003). Estudos recentes no Peru e Sri Lanka demonstraram a associação da forma hemorrágica da doença a determinados genótipos virais. Alguns determinantes genéticos específicos que explicariam tal associação foram identificados (Watts *et al.*, 1999; Messer *et al.*, 2002; Messer *et al.*, 2003). Estudos ainda pouco conclusivos associam outros fatores à gravidade da doença, como idade, fatores genéticos e estado nutricional do hospedeiro (Rothman, 2003). Por fim, estudos epidemiológicos têm associado a resposta imune do hospedeiro ao vírus e o desenvolvimento da forma hemorrágica da infecção. Vários mecanismos para tal têm sido considerados, como deposição de complexos imunes, reação cruzada de anticorpos com endotélio vascular, intensificação da infecção mediada por anticorpos, ativação do sistema complemento e seus produtos, liberação exacerbada de mediadores solúveis, como citocinas, e outros (Bokisch *et al.*, 1973; Theofilopoulos *et al.*, 1976; Halstead, 1979; Malasit, 1987; Halstead, 1989; Markoff *et al.*, 1991; Chungue *et al.*, 1994; Kurane *et al.*, 1994; Morens, 1994; Falconar, 1997; Chaturvedi *et al.*, 2000; Libraty *et al.*, 2002; Mangada *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005).

1.3 IMUNOPATOGENESE, LIPOXINAS E SOCS

A maioria dos dados epidemiológicos sugere que o desenvolvimento da FHD/SCD é mediado pela resposta imune do hospedeiro. Na Tailândia, foi demonstrado que em mais de 99% dos casos de FHD, os indivíduos apresentaram anticorpos heterólogos contra o sorotipo que causou a FHD (Kurane, 2007). Na epidemia de dengue ocorrida em Cuba em 1981 pelo sorotipo 2 do vírus, a maioria dos casos de FHD ocorreu em indivíduos que adquiriram previamente anticorpos em outras epidemias contra o sorotipo 1 nos anos de 1977 e 1978 (Guzman *et al.*, 1990). Esses resultados sugerem que a presença de anticorpos heterólogos após a segunda infecção pelo vírus da dengue é um fator de risco importante para o desenvolvimento da FHD/SCD (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005). Além disso, já foi demonstrado que a

transferência passiva de anticorpos contra os DENV em primatas não humanos previamente infectados foi responsável pelo aumento da viremia nesses animais. Estudos mais recentes em humanos também demonstram correlação positiva entre o pico da viremia e a gravidade da doença, sustentando a ideia da importância do fenômeno de ADE para a patogênese (Vaughn *et al.*, 2000; Rothman, 2004). Outro exemplo relevante que reforça essa teoria é a ocorrência de FHD durante a infecção primária pelos DENV em crianças durante o primeiro ano de vida, nascidas de mães imunes aos DENV. Essas crianças teriam adquirido anticorpos pela via transplacentária, sugerindo o papel *in vivo* do fenômeno de ADE nas infecções pelos DENV (Stephenson, 2005; Halstead, 2007). Além dos anticorpos de reatividade cruzada contra outros sorotipos, alguns estudos relataram que anticorpos anti-dengue podem apresentar reação cruzada com plaquetas, fatores de coagulação e células endoteliais (Falconar, 1997). Tais anticorpos poderiam contribuir para a patogênese durante a infecção por dengue, causando destruição de plaquetas (Saito *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006). Anticorpos anti-NS1 também parecem se ligar a células endoteliais, levando-as ao processo de apoptose (Lin *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2006). Todos esses eventos parecem favorecer o aumento da permeabilidade vascular característico da FHD/SCD.

O modelo de intensificação da infecção mediada por anticorpos postula que alguns anticorpos específicos contra o vírus da dengue, sejam eles anticorpos de reatividade cruzada provenientes de uma infecção anterior ou anticorpos sub-neutralizantes para um dado sorotipo, podem interagir com o vírus sem que haja neutralização e, então, através do uso de receptores Fcγ em macrófagos e monócitos, acentuar a entrada do vírus nas células-alvo (Clyde *et al.*, 2006). Esse modelo prediz que anticorpos sub-neutralizantes são, pelo menos em parte, responsáveis pelo risco aumentado de manifestação da FHD em infecções secundárias. Além dos anticorpos de reatividade cruzada contra outros sorotipos, alguns estudos relataram que anticorpos anti-Dengue podem apresentar reação cruzada com plaquetas, fatores de coagulação e células endoteliais (Falconar, 1997). Tais anticorpos poderiam contribuir para a patogênese durante a infecção pelo dengue, causando destruição de plaquetas (Erfan *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2000; Oishi *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2004). Anticorpos anti-NS1 também parecem se ligar a células endoteliais, levando as mesmas ao processo de apoptose (Lin *et al.*, 2003, 2005). Esses eventos parecem favorecer o aumento da permeabilidade vascular característico da FHD.

A imunopatogênese do dengue provavelmente envolve outros fatores, além de anticorpos circulantes provenientes de infecções prévias. Respostas indesejáveis de linfócitos B e T e efeitos de citocinas tanto nas células infectadas quanto nas células adjacentes, sejam elas leucócitos, hepatócitos ou células endoteliais, também parecem ser importantes (Clyde *et al.*, 2006). O modelo do “pecado antigênico original” propõe que uma resposta imune inapropriada a uma infecção secundária se dê pela expansão clonal de linfócitos T de memória de reatividade cruzada que são específicos para a infecção primária e não para a infecção corrente. Isso resultaria em um atraso na eliminação viral e/ou no aumento da secreção de citocinas (Clyde *et al.*, 2006). Há evidências de que isso pode ocorrer durante infecções secundárias (Mongkolsapaya *et al.*, 2003), e alguns estudos recentes identificaram epitopos virais que, no contexto de certos tipos de HLA (*Human leukocyte antigen*), estão associados ao aumento da resposta imune e gravidade da infecção (Zivna *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 2005; Mongkolsapaya *et al.*, 2006).

Sejam ou não resultado do “pecado antigênico original”, as citocinas desempenham um papel fundamental na imunopatogênese da infecção pelo vírus da dengue. Existe uma grande produção de citocinas durante a FHD/SCD, liberadas principalmente por células T, monócitos/macrófagos e células endoteliais; e a expressão de muitos de seus receptores é encontrada no soro dos pacientes com FHD/SCD em relação aos pacientes com a forma clássica da doença (FD). As citocinas comumente encontradas em altos níveis no soro de pacientes com FHD incluem: TNF- α , várias interleucinas: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-1 β e IFN- γ (Chaturvedi *et al.*, 2000; Dewi *et al.*, 2004; Green; Rothman, 2006; Kurane, 2007; Pang *et al.*, 2007). As citocinas desempenham papel fundamental na imunopatogênese da infecção pelo vírus da dengue, especificamente devido ao papel pró-inflamatório que elas exercem sobre as células endoteliais. O TNF- α foi a primeira citocina a ser implicada na patogênese da FHD (Chaturvedi, 2006). Ela pode atuar localmente na ativação de macrófagos, entretanto, sua atividade sistêmica pode levar ao aumento da permeabilidade vascular (Clyde *et al.*, 2006; Kurane, 2007). O soro de pacientes com infecção aguda pelos DENV tem níveis aumentados de TNF- α (Vitarana *et al.*, 1991; Hober *et al.*, 1993; Hober *et al.*, 1996; Chaturvedi *et al.*, 2000; Chaturvedi, 2006). A associação de TNF- α com as manifestações mais graves da doença é confirmada por diferentes modelos animais (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Shresta *et al.*, 2006) e por estudos *in vitro* (Dewi *et al.*, 2004; Chua *et al.*, 2005). É importante ressaltar

também a importância dos interferons do tipo I (IFN- α , IFN- β) na resposta contra o DENV. Já foi demonstrado que a expressão das proteínas virais NS4b, NS2a e NS4a funciona de alguma forma como inibidores da sinalização por IFNs do tipo I (Muñoz-Jordán *et al.*, 2003). A proteína NS5 também foi implicada na inibição da sinalização por IFN do tipo 1, através de sua ligação com STAT2 e consequente marcação para degradação através de mecanismos ainda não estabelecidos (Ashour *et al.*, 2009).

O processo inflamatório e os fenômenos de hemostasia estão intimamente interligados, conforme evidenciado na biologia de plaquetas. Enquanto o papel clássico das plaquetas é mediar a formação do tampão hemostático, estudos demonstraram que as plaquetas também desempenham uma função importante na inflamação (Goerge *et al.*, 2008). Por exemplo, plaquetas foram associadas à promoção de respostas inflamatórias na arteriosclerose e após isquemia cerebral (Goerge *et al.*, 2008). No início do processo inflamatório, as funções pró-trombóticas das plaquetas são reduzidas; no entanto, plaquetas ativadas são capazes de aumentar a expressão de moléculas inflamatórias no endotélio (Goerge *et al.*, 2008). Por fim, esse grupo propôs que, durante a plaquetopenia, a atividade inflamatória pode desencadear hemorragia grave.

Podemos observar, então, que a patogênese das formas graves da infecção pelo DV aparenta estar diretamente relacionada com uma resposta imune desequilibrada, que potencializa a adsorção e a atividade viral. Além disso, é clara a importância do comportamento endotelial e a atividade das plaquetas, bem como a relação hemostasia/inflamação na fisiopatologia da FHD/SCD (Chatuverdi, *et al.*, 2000; Huerta-Zepeda, *et al.*, 2008; Tan; Alonso, 2009).

Dentre as moléculas mediadoras da atividade inflamatória e da ativação tanto endotelial quanto plaquetária, os eicosanoides são uma classe de mediadores lipídicos de grande importância. Atuam tanto na manutenção da homeostase fisiológica quanto nas condições patológicas, ambas as ações sendo extremamente abrangentes e relevantes em quase todos os sistemas e tecidos dos mamíferos (Brock; Peters-Golden, 2007).

Eicosanóide é uma palavra de origem helênica, sendo "eikosi" a palavra grega para "vinte". O significado etimológico literal da palavra seria "semelhante a vinte". De fato, os eicosanoides são metabólitos oxigenados de um ácido graxo insaturado de vinte carbonos, o ácido araquidônico (Breyer *et al.*, 2007).

Os eicosanoides são liberados por células de diferentes tipos celulares e atuam

em concentrações de nanomolar nas células-alvo, utilizando receptores acoplados à proteína G (GPCRs), que são seus receptores típicos (Drachman; Rothstein, 2000). Embora os eicosanoides tenham sido inicialmente reconhecidos por sua capacidade de induzir respostas biológicas, como a contração da musculatura lisa, edema e agregação plaquetária, eles têm sido extensivamente estudados como participantes em vários processos, incluindo inflamação e resposta imune, em diversas condições (Brock; Peters-Golden, 2007).

A síntese de eicosanoides está condicionada à disponibilidade de ácido araquidônico livre para subsequente metabolismo. O ácido araquidônico é originado dos fosfolipídios de membrana, podendo ser removido desses fosfolipídios (deacilação) ou reincorporado neles (reacilação). O teor de ácido araquidônico pode variar entre diferentes tipos celulares. A deacilação dos fosfolipídios de membrana é catalisada pela enzima fosfolipase A2 (PLA2) (Breyer *et al.*, 2007).

Dos mediadores lipídicos conhecidos como eicosanoides, uma classe notável, com significativo envolvimento nos processos inflamatórios, são os leucotrienos. Essa designação deriva das células onde são encontrados e de sua estrutura molecular. Os leucotrienos desempenham papéis fundamentais nos processos de manutenção da homeostasia vascular e respiratória, além de participarem ativamente em fenômenos inflamatórios (Yokomizu, *et al.*, 2000; Shimizu, 2009). Pode-se afirmar que os leucotrienos possuem funções fisiológicas na imunidade inata e, em condições patológicas, estão associados a doenças inflamatórias (Evans *et al.*, 2007). O primeiro estágio na síntese dos leucotrienos envolve a oxidação do ácido araquidônico, sendo realizada pela enzima 5-Lipoxigenase (5-LO) (Evans *et al.*, 2007; Shimizu, 2009). A 5-LO faz parte da família das lipoxigenases, que é composta por enzimas contendo ferro não associado a um grupo heme, catalisando a oxidação de ácidos graxos poliênicos para formar hidroperóxidos lipídicos (Shimizu, 2009). Essas enzimas requerem um ácido graxo com duas ligações duplas em *cis*, separadas por um grupo metileno, como substrato (Evans *et al.*, 2007; Shimizu, 2009). O ácido araquidônico, que apresenta várias ligações duplas nessa configuração, é metabolizado em ácidos hidroperoxi-eicosatetraenóicos (HPETE), variando conforme o local de inserção do grupo hidroperóxido (Evans *et al.*, 2007; Shimizu, 2009). Esses intermediários instáveis são subsequentemente metabolizados por diversas peroxidases e convertidos em seus equivalentes de ácidos graxos hidroxilados (HETE) (Evans *et al.*, 2007; Shimizu, 2009).

Quando eosinófilos, mastócitos, leucócitos polimorfonucleares e/ou monócitos são ativados, a 5-LO é translocada para a membrana nuclear, onde se associa com uma proteína conhecida como proteína ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP), uma proteína integral de membrana essencial para a atividade da 5-LO e, conseqüentemente, para a biossíntese dos leucotrienos (Evans *et al.*, 2007; Shimizu, 2009). Uma vez associada à FLAP, a 5-LO converte o ácido araquidônico em 5-HPETE e, agindo sobre este produto, o transforma em um intermediário instável, o leucotrieno A₄ (LTA₄). Este, por sua vez, é convertido pela LTA₄ hidrolase em leucotrieno B₄ (LTB₄) ou, pela ação da LTC₄ sintase, em cisteinil leucotrieno C₄ (LTC₄). Este último serve como substrato para a formação dos demais cisteinil leucotrienos, LTD₄ e LTE₄, que desempenham um papel importante nos sistemas respiratório e cardiovascular (Evans *et al.*, 2007; Shimizu, 2009).

O LTB₄ é um potente agente quimiotraente para leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), eosinófilos e monócitos, sinalizando através de seus receptores BLT1 e BLT2, que são receptores do tipo de sete domínios transmembrana acoplados à proteína G (Yokomizu *et al.*, 2000; Shimizu, 2009). Em concentrações elevadas, o LTB₄ estimula a agregação de neutrófilos e promove nestas células a degranulação e a geração de superóxido (Martel-Pelletier, 2003; Shimizu, 2009). O LTB₄ também promove a adesão dos neutrófilos a células do endotélio vascular e sua transmigração através destas, além de estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e linfócitos (Martel-Pelletier, 2003; Shimizu, 2009).

No entanto, a 5-LO não desempenha apenas um papel no desencadeamento da atividade inflamatória. Pode-se afirmar que esta enzima possui um papel dual, tanto na produção de agentes pró-inflamatórios como o LTB₄, quanto na promoção da síntese de fatores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, conhecidos como lipoxinas (LX). As lipoxinas foram a primeira família de mediadores com propriedades anti-inflamatórias e pró-resolutivas identificada *in vivo* (Colgan *et al.*, 1993; Serhan *et al.*, 2000). A biossíntese das lipoxinas é transcelular, ocorrendo a partir da interação célula-célula nos fenômenos inflamatórios, com destaque para a interação entre neutrófilos e plaquetas. Nesse processo, a 12-lipoxigenase, presente nas plaquetas, fornece o 12-HETE para o neutrófilo. Em seguida, a 5-LO do neutrófilo ativado converte esse substrato em lipoxina A₄ (LXA₄). A LXA₄ desloca o conjunto dos fenômenos inflamatórios para um estado resolutivo (Shimizu, 2009), através da sinalização sobre seus receptores ALX (também conhecido como LXAR) e/ou AhR

em diversas células. Nos neutrófilos, ela promove apoptose dessas células no tecido, diminuindo sua taxa de transmigração; nos macrófagos, promove migração não-flogística e estimula a limpeza dos neutrófilos apoptóticos no tecido (Petasis *et al.*, 2005); nos neutrófilos, macrófagos e células do endotélio vascular e do parênquima dos tecidos (Evans *et al.*, 2007), reduzindo a síntese dos demais eicosanóides, alterando assim toda a orquestra inflamatória para um fenótipo pró-resolutivo e anti-inflamatório (Chiang *et al.*, 2005; Serhan *et al.*, 2008). Por outro lado, a 15-lipoxigenase (15-LO) desempenha um papel muito semelhante à 12-LO. No entanto, esta enzima está presente nas células endoteliais e nas células da lâmina própria, fornecendo o seu produto, 15-HETE, para os neutrófilos que estão interagindo com estas células, propiciando a produção de lipoxinas pela 5-LO dos neutrófilos ativados (Chiang *et al.*, 2005; Serhan *et al.*, 2008).

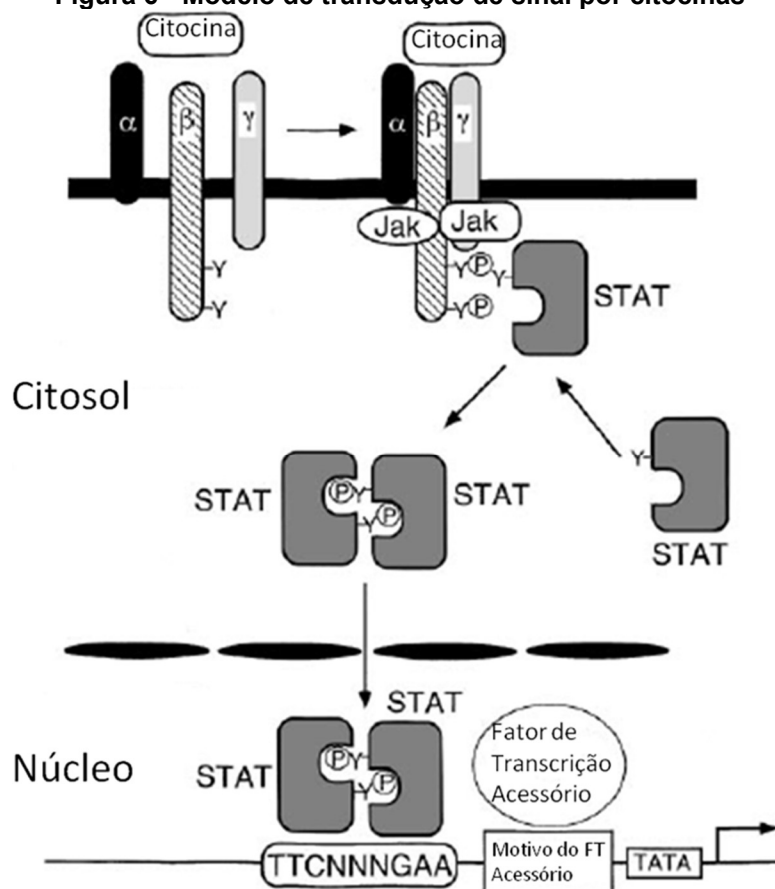
Em 2001, Qiu e colaboradores demonstraram que a lipoxina A4 (LXA4), assim como seu análogo a 15-epi-lipoxina A4 (ou ATL, do inglês Aspirin Triggered Lipoxin), seriam capazes de induzir a expressão da proteína NAB1. Essa proteína, inicialmente associada à atividade anti-inflamatória dos glicocorticóides, atua como cofator nuclear, suprimindo a transcrição de genes associados à atividade inflamatória em neutrófilos e células endoteliais. Mais recentemente, foi demonstrada a participação da proteína SOCS-2 (do inglês *Suppressor of Cytokine Signalling*) na regulação da produção de citocinas e quimiocinas induzida por patógenos causada pela sinalização provocada pela LXA4 e pela ATL, através de seus receptores ALX e AhR (Machado *et al.*, 2006).

Mas quem são as proteínas SOCS? A família de proteínas SOCS é composta por oito membros, a proteína CIS e SOCS-1 à 7. Características comuns a toda a família incluem um domínio central de interação com resíduos de tirosina fosforilados denominado de SH2 e um domínio C-terminal conservado denominado de SOCS box. A principal atividade associada a esta família de proteínas é atenuar a transdução de sinal desencadeada por citocinas, através de sua interação direta com as cadeias citoplasmáticas de receptores ou via inibição de intermediários de sinalização, neste caso, a família das Janus cinases (JAKs, do inglês *Janus kinase*) e das STATs (do inglês *Signal Transducer and Activators of Transcription*) (Elliot; Johnston, 2004). Sendo assim, é relevante vermos brevemente o funcionamento da sinalização desencadeada por citocinas via JAK/STAT.

As JAKs são cinases relativamente grandes, com aproximadamente 1150

aminoácidos e peso molecular aparente entre 120 e 130 kDa. Quatro JAKs mamíferas foram identificadas até o presente: Jak1, Jak2, Jak3 e Tyk2. Na estrutura geral das JAKs, encontramos o sítio catalítico denominado JH1 em sua porção C-terminal, enquanto na porção N-terminal encontramos a região de ligação aos receptores de citocinas. Os papéis principais das JAKs na sinalização desencadeada por citocinas são os seguintes: primeiro, fosforilar resíduos de tirosina nas cadeias intracitoplasmáticas dos receptores, criando assim sítios de ancoragem para proteínas com domínios de ligação a fosfotirosina; segundo, agir sobre estas proteínas ancoradas, que também lhe servem como substrato. As proteínas que utilizam este sítio de fosfotirosina para se ancorar são principalmente as STATs. Sete proteínas STAT são conhecidas nos mamíferos. Elas têm um tamanho médio de 750 a 850 aminoácidos. Assim, após a fosforilação dos resíduos de tirosina nos receptores pelas JAKs, as STATs podem se ancorar e, uma vez ancoradas, são fosforiladas pelas JAKs, o que causa seu desligamento do sítio de ancoragem no receptor e sua dimerização (Figura 6). Esta forma dimérica de STAT pode então translocar-se para o núcleo, onde modulará a expressão de seus genes-alvos (Leonard; O'Shea, 1998; Subramaniam *et al.*, 2001).

Figura 6 - Modelo de transdução de sinal por citocinas



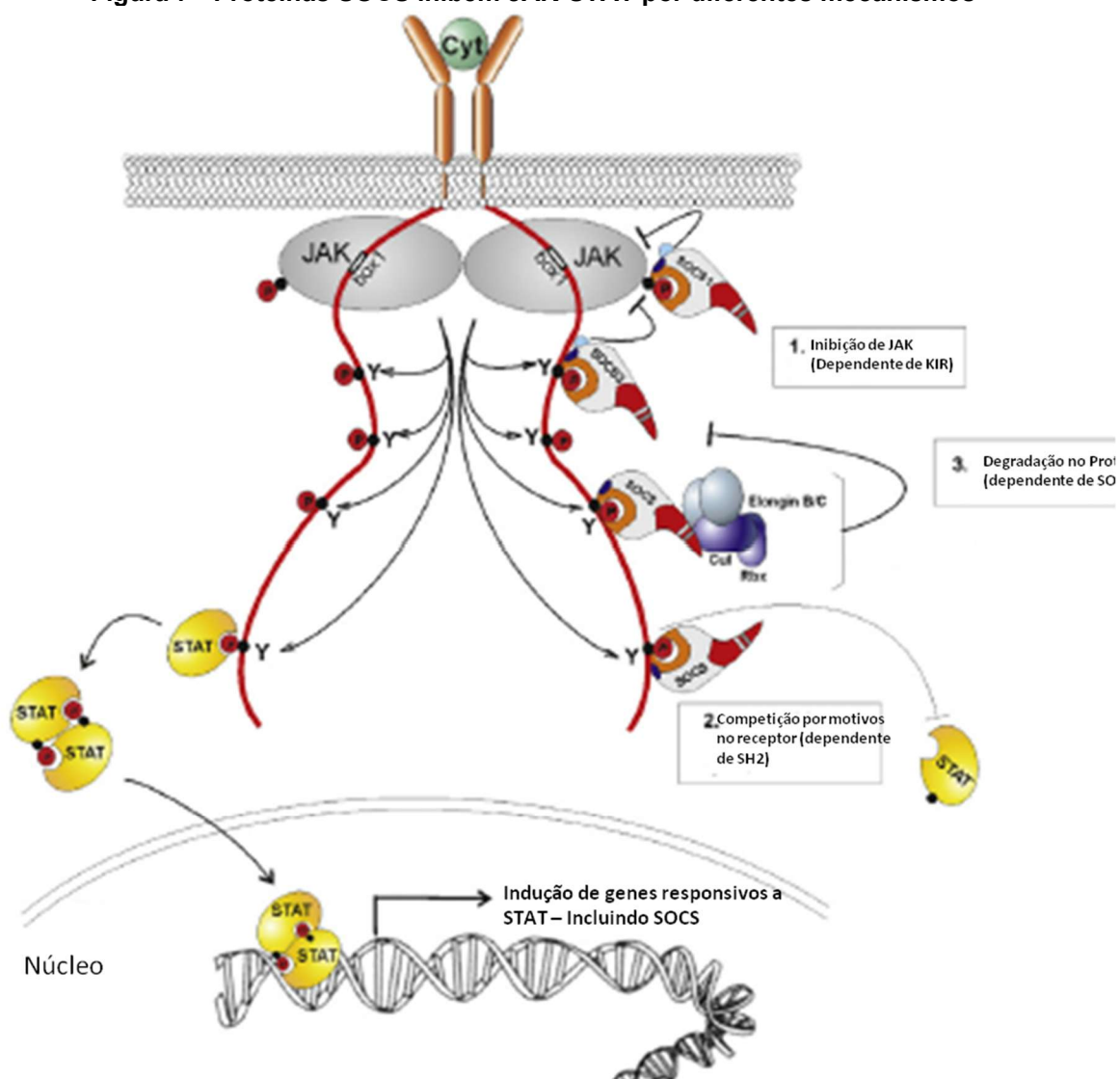
Podemos observar que a adição de citocinas ativa as JAKs, as quais, por sua vez, fosforilam os sítios de ancoragem baseados em tirosina no receptor. As STATs se ancoram através de seus domínios SH2, interagindo com resíduos de tirosina fosforilados. Em seguida, as STATs são fosforiladas, formam homo ou heterodímeros e translocam para o núcleo, onde se ligam às suas sequências-alvo.

Fonte: adaptada de O'Shea e Murray (2008).

As proteínas da família SOCS assumem um papel fundamental como os principais reguladores negativos da via de sinalização JAK-STAT. De maneira geral, entre os diversos genes induzidos pelos dímeros de STAT, encontram-se os genes da família SOCS, destacando-se especialmente SOCS-1, SOCS-2 e SOCS-3. Essas proteínas podem modular a sinalização pelos receptores de citocinas por meio de múltiplos mecanismos complementares (Figura 7). Em primeiro lugar, SOCS-1 e SOCS-3 podem inibir a atividade das JAKs agindo como pseudo-substratos, por meio de um domínio presente em suas porções N-terminais conhecido como pequena região inibidora de cinases (KIR, do inglês *small Kinase Inhibitory Region*) (Yasukawa *et al.*, 1999; Babon *et al.*, 2006). SOCS-1 pode ligar-se diretamente à alça de ativação fosforilada de JAK2, enquanto SOCS-3 parece associar-se ao receptor em uma região muito próxima à JAK, podendo causar inibição estérica da cinase (Nicholson *et al.*, 2000; Giordanetto; Kroemer, 2003). Em segundo lugar, as proteínas SOCS podem suprimir a sinalização competindo com transdutores de sinal subsequentes pelos sítios

de ancoragem fosforilados nos receptores ativados (Ram; Waxman, 1999). E, em terceiro lugar, as proteínas SOCS podem regular a transdução de sinal por meio da poliubiquitinação de seus substratos, associando-se à maquinaria de ubiquitinação. A ubiquitinação de um substrato pode levar à sua degradação nos proteassomas, internalização (no caso de receptores) ou encaminhamento para outros sítios celulares (Yoshimura *et al.*, 2007).

Figura 7 - Proteínas SOCS inibem JAK-STAT por diferentes mecanismos



Na ilustração, à esquerda, observamos que a ligação da citocina (Cyt) ao seu receptor induz a reorganização das cadeias do receptor, levando à ativação das JAKs associadas por meio de fosforilação cruzada. As JAKs, por sua vez, fosforilam os domínios citoplasmáticos dos receptores, criando os sítios de ancoragem para proteínas citoplasmáticas, como as STATs. Após a fosforilação, as STATs migram para o núcleo para induzir os genes-alvo. À direita, as proteínas SOCS são representadas atenuando a sinalização pelo receptor por mecanismos distintos (ver no texto).

Fonte: adaptada de Piesseveaux et al. (2008).

Outro papel importante das proteínas SOCS é a capacidade de se regular

mutuamente. SOCS-2 pode ligar-se a SOCS-1 e SOCS-3 através de um mecanismo que parece estar associado à SOCS box das proteínas alvo e da própria SOCS-2, promovendo assim uma regulação negativa das outras SOCS por meio da marcação com ubiquitina para a degradação no proteassoma (Tannahill *et al.*, 2005; Piessevaux *et al.*, 2006).

É extremamente relevante notar que, recentemente, a família SOCS foi identificada como um grupo de proteínas do hospedeiro que pode ser explorada para o benefício viral. Em 2008, Pauli e colaboradores demonstraram que, através da ação de sua proteína NS1, o vírus Influenza A foi capaz de inibir a sinalização de IFN tipo I, induzindo SOCS-3. Já em 2010, Jia e colaboradores demonstraram que a NS1 do vírus Influenza A é capaz de induzir não só SOCS-3, mas também SOCS-1, reduzindo efetivamente a resposta via IFN do tipo I e inibindo fortemente a fosforilação de STAT. O vírus da hepatite C (HCV) também foi revelado como um subversor das proteínas SOCS, visto que, durante sua infecção, foi observado que sua proteína estrutural do capsídeo é capaz de aumentar em mais de cem vezes a expressão de SOCS-3 nos hepatócitos infectados (Persico *et al.*, 2007). Também foi demonstrado que o HCV é capaz de induzir a expressão de SOCS-1 em linfócitos T e B (Yao *et al.*, 2008). Considerando o claro papel que as proteínas SOCS desempenham no controle da resposta imune do hospedeiro e a clara associação da subversão de sua atividade por agentes virais, sua participação em doenças infecciosas demanda maior investigação.

2 JUSTIFICATIVA

O vírus da dengue (DENV) é o agente etiológico da mais significativa arbovirose no mundo (Yauch *et al.*, 2008). A dengue está associada a inúmeras epidemias urbanas e é atualmente uma das maiores ameaças à saúde pública em países em desenvolvimento, com impacto significativo nos aspectos econômicos, políticos e sociais. Não obstante, até o momento, não há tratamento específico ou vacina disponível para essa doença (Kyle *et al.*, 2008; Pang, 2007; Shrestha *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2003). Estima-se que 3,5 bilhões de pessoas, ou metade da população mundial, estejam sob risco de infecção pelo DENV em países tropicais e subtropicais (Kyle *et al.*, 2008). Dado o contínuo aumento e mobilidade da população humana, e a ausência de uma vacina efetiva ou terapia antiviral reconhecida, está claro que a dengue, em todas as suas formas, representa e continuará representando um importante problema de saúde pública nos próximos anos (Holmes *et al.*, 2003). Apenas no Brasil, em 2010, foram reportados mais de 400.000 casos de infecção por dengue até a 26ª semana epidemiológica.

Enquanto a última década testemunhou importantes avanços na biologia do DENV, incluindo as determinações estruturais da partícula viral e das proteínas-chave envolvidas, as análises dos mecanismos de tradução e replicação viral, além da caracterização funcional das proteínas virais; a patogênese do dengue permanece pouco elucidada, onde a complexa inter-relação entre os fatores virais e do hospedeiro ainda não é bem conhecida (Clyde *et al.*, 2006; Tan; Alonso, 2009). As observações clínicas da doença têm fornecido algumas informações a respeito da patogênese da infecção pelo DENV, e o estudo de mediadores inflamatórios em um modelo que mimetiza grande parte dos sinais clínicos e marcadores moleculares observados na infecção humana (Souza *et al.*, 2009) é ideal para o estudo dos mecanismos citomoleculares envolvidos na patogênese da infecção pelo dengue.

Sendo a 5-lipoxigenase uma enzima cujos produtos biologicamente ativos, como os leucotrienos e lipoxinas, são de alta relevância tanto no desencadeamento quanto na resolução de fenômenos inflamatórios agudos (Serhan *et al.*, 2008), e também, as proteínas SOCS estão fortemente envolvidas na regulação da resposta imune mediada por citocinas, elucidar suas participações na patogênese deste modelo experimental se mostra um feito de franca importância.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo geral estudar o papel desempenhado pela enzima 5-lipoxigenase e seus produtos e pela proteína regulatória SOCS-2 em um modelo experimental de infecção pelo *Dengue virus* sorotipo 3.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a resposta inflamatória e a mortalidade em animais deficientes para 5-lipoxigenase (5-LO^{-/-}) e deficientes para SOCS-2 (SOCS-2^{-/-});
- Analisar os sinais clínicos da infecção, incluindo a quantificação dos níveis de hematócrito e a contagem das plaquetas circulantes;
- Analisar os parâmetros inflamatórios característicos do modelo, como a quantificação das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IFN- γ) e das quimiocinas (CXCL1);
- Quantificar o infiltrado neutrofílico nos tecidos através do ensaio indireto da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) no fígado, baço e pulmões dos animais 5-LO^{-/-} e SOCS-2^{-/-} em comparação com seus controles WT;
- Analisar os níveis de transcrito (mRNA) para SOCS-1, SOCS-2 e SOCS-3 nos tecidos (baço e fígado) dos animais infectados;
- Titular a carga viral no sangue (plasma) e nos tecidos (fígado e baço) dos animais 5-LO^{-/-}, SOCS-2^{-/-} e WT por meio de ensaio de placa (titulação em células).

4 METODOLOGIA

4.1 VÍRUS

Neste trabalho, foi utilizado o sorotipo 3 do vírus da dengue (DENV-3). A amostra clínica do vírus foi gentilmente cedida pela professora Erna Geissen Kroon do Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia desta instituição. O vírus foi adaptado ao hospedeiro murino pelo Dr. George Ignatyev, pesquisador colaborador do Vector Institute da Rússia. Todo o procedimento, bem como a realização deste projeto, ocorreu no laboratório de Interação Microrganismo/Hospedeiro do Departamento de Microbiologia desta instituição.

Brevemente, para a adaptação do vírus e aumento da virulência do isolado no hospedeiro murino, o mesmo foi inicialmente injetado por via intracerebral (i.c) em camundongos neonatos (com no máximo 2 dias de vida - linhagem BALB/c). No quinto dia após a infecção, os cérebros destes animais foram retirados e homogeneizados em uma solução de 10% p/v em PBS. Após centrifugação a 6.000 rpm, 4°C por 1 minuto, o sobrenadante foi coletado e essa solução foi novamente injetada (i.c) em novos animais. Foram realizadas várias passagens (em média 8) como descrito anteriormente por Atrasheuskaya *et al.* (2003). Após a última passagem (i.c), animais com 2 semanas de vida foram infectados por via intraperitoneal (i.p). O aparecimento dos sinais clínicos da doença foi verificado (ex: redução da exploração do ambiente, arqueamento do dorso, paralisia dos membros posteriores). Ao aparecimento desses sinais, os animais moribundos foram sacrificados, e os cérebros retirados para a realização de novo homogeneizado (a 10%), utilizado para nova passagem em novos animais. O mesmo procedimento foi realizado com animais de 3 e 4 semanas de vida para infecções i.p com o DENV-3. A última passagem do DENV-3 obtida dos animais BALB/c com 4 semanas foi utilizada para novas 5 passagens sequenciais no cérebro de animais neonatos e posteriormente coletadas para produção dos estoques. Esses estoques foram armazenados em freezer a -70°C. Para a confirmação da adaptação do vírus em camundongos, animais BALB/c machos com 4 semanas de idade (n = 8 animais por grupo) foram infectados com diluições seriadas da suspensão do cérebro proveniente do estoque viral por via i.p, e a taxa de letalidade dos animais avaliada. Além disso, células LLC-MK2 e células da linhagem C636 de mosquito também foram infectadas, e os efeitos citopáticos do vírus avaliados (Atrasheuskaya *et al.*, 2003).

4.1.1 Titulação do vírus da Dengue

As células LLC-MK2 foram cultivadas em meio DMEM com 5 a 6% de soro fetal bovino, na presença de antibióticos (fungizona 5 mg/mL, penicilina 10.000 U/L, gentamicina 25 mg/mL). Posteriormente, as células foram tripsinizadas (200 U/mL), homogeneizadas e semeadas em placas de seis poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço. As placas preparadas foram incubadas em uma estufa a 37°C por aproximadamente 24 horas, até que os poços apresentassem uma monocamada de células com uma confluência de 70% a 80%. As amostras de fígado, baço e pulmão foram pesadas, maceradas com "cadinho" e pistilo de porcelana estéreis, e diluídas serialmente em meio DMEM com antibióticos, na ausência de soro fetal bovino. Em cada poço de uma placa, foram adicionados 400 µL de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-7}) de uma determinada amostra. O controle de células correspondeu a um poço não inoculado, ao qual foi acrescentado apenas o meio DMEM com antibióticos, na ausência de soro fetal bovino. As placas foram incubadas por um período de uma hora e meia a 37°C, durante o qual foram gentilmente movimentadas de quinze em quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais do inóculo sobre a monocamada de células. Após o período de adsorção, o meio foi removido dos poços e descartado, e as células foram lavadas com uma solução tampão de fosfato ("*phosphate-buffered saline* – PBS") (0.4 M NaCl e 10 mM de Na_3PO_4). Em seguida, foi adicionado meio 199 contendo 1.5% de carboximetilcelulose, antibióticos e 3% de soro fetal bovino, e as placas foram incubadas a 37°C por 7 dias ou até que aparecessem efeitos citopáticos (observados ao microscópio). As placas foram fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta em PBS para a determinação do título das amostras, expresso em PFU/mL (unidades formadoras de placas por mililitro).

4.1.2 RT-PCR – Reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa

4.1.2.1 Extração do RNA

As amostras de tecido (baço, fígado e pulmões, com 50 a 100 mg de tecido) foram homogeneizadas em 1 mL de TRIZOL (GIBCO/BLR Laboratories, Grand Island, N.Y., EUA) utilizando um homogeneizador elétrico. As amostras homogeneizadas

foram incubadas por 5 a 10 minutos a uma temperatura de 15° a 30° C, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoproteicos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de clorofórmio de alta qualidade para cada 1 mL de TRIZOL. A mistura foi agitada em vortex e depois incubada por 3 minutos a 15° a 30° C. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 2 a 8° C. Após a centrifugação, a mistura ficou separada em uma fase inferior (rosa), contendo fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permaneceu exclusivamente na fase aquosa, que foi transferida para um novo microtubo. O RNA foi precipitado com isopropanol (MERCK) de altíssima qualidade (500 µl de isopropanol para cada 1 ml de TRIZOL). As amostras foram incubadas por 10 minutos a 15 a 30° C e depois centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 2 a 8° C, formando um sedimento branco. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 1 ml de etanol 75% (diluído em água tratada com DEPC) para 1 ml de TRIZOL. O tubo foi agitado no vortex para que o sedimento se soltasse do fundo. Em seguida, foi realizada nova centrifugação a 7.500 x g (10.000 rpm) por 5 minutos a 2 a 8° C. Após o descarte do sobrenadante, o tubo foi deixado aberto por 5 minutos para secagem do sedimento, que foi, então, diluído em água de alta qualidade tratada com DEPC em volume suficiente para diluir toda a amostra. O RNA foi armazenado a -70° C.

4.1.2.2 Quantificação do RNA

A quantificação das amostras de RNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Primeiramente, o aparelho foi calibrado com água de alta qualidade tratada com DEPC, e em seguida, a opção de leitura de RNA já definida no aparelho foi selecionada. A leitura do branco também foi realizada com água tratada com DEPC. O RNA foi quantificado pela absorção a 260 nm, utilizando 2 µl da amostra pura. O aparelho forneceu a concentração em ng/µL e a correlação 260/280 (RNA/proteínas).

4.1.2.3 Preparo do cDNA por Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa do mRNA dos tecidos animais foi realizada utilizando 2,0 µg de RNA, aos quais foi adicionado 50 µM do primer Oligo dT (15) (Promega Cor., Madison WI, EUA). Houve uma incubação por 5 minutos a 70°C,

seguida por 5 minutos no gelo para permitir a separação das fitas de RNA, o anelamento do primer e impedir a formação de artefatos inespecíficos, respectivamente. Em seguida, foi adicionada uma mistura de reagentes em um volume de 14,5 µl, contendo 1,5 µl de dNTPs a 100 mM (Promega Cor., Madison, WI, EUA), 4 µl de tampão M-MLV 5X (Promega Cor., Madison WI, EUA), 200 U da enzima Transcriptase reversa-M-MLV (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 8,5 µl de água Milli-Q autoclavada. A mistura foi incubada por 2 horas a 42°C, quando ocorreu a transcrição reversa do mRNA. As amostras de cDNA foram conservadas a -20°C.

4.1.2.4 PCR específica

Para as reações subsequentes de amplificação, 5 µL da amostra de cDNA foram utilizados. A PCR foi realizada em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 1,5 µl de primer senso a 5 µM, 1,5 µl de primer anti-senso a 5 µM e 2 µl de água Milli-Q. A reação foi conduzida utilizando o protocolo para PCR com SYBR Green do termociclador Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em resumo, foi feita uma incubação inicial de 1 minuto a 95°C e, em seguida, 15 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto para anelamento e extensão a 60°C. Esses dois últimos passos foram repetidos 40 vezes, seguidos pela curva de melting: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e uma rampa de subida lenta de temperatura até 95°C. Os resultados foram obtidos com auxílio do software Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando as seguintes fórmulas: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct -$ o valor de calibração encontrado através da subtração das médias do Ct do grupo controle. Em que $\Delta Ct = Ct$ da gene alvo – Ct do gene constitutivo do camundongo (18S). As sequências dos iniciadores utilizados foram as seguintes: 18S Senso: 5' CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG 3'; 18S Anti-Senso: 5' CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC 3'; SOCS-1 Senso: 5' ACA CTC ACT TCC GCA CCT TC 3'; SOCS-1 Anti-senso: 5' GAA GCC ATC TCC ACG CTG 3'; SOCS-3 Senso: 5' GTT GAG CGT CAA GAC CCA GT 3'; SOCS-3 Anti-senso: 5' GGG TGG CAA AGA AAA GGA G 3'; SOCS-2 Senso: 5' CGG CGG TGG AGG CGA TCT G 3'; SOCS-2 Anti-Senso: 5' CCG AAA TGG TGG CGG AGG GG 3'.

4.2 ANIMAIS

Nos experimentos para avaliação do papel da 5-LO no modelo de infecção pelo DEN-2, foram utilizados animais da linhagem C57BL/6 selvagens (WT), animais deficientes em 5-LO (5-LO^{-/-}) e animais deficientes para SOCS-2 (SOCS-2^{-/-}). Todos os animais eram machos com 8 semanas de idade (6 animais por grupo). A infecção foi realizada pela via intraperitoneal (i.p) com o vírus da Dengue sorotipo-3 (DEN-3) adaptado. Os animais foram mantidos em micro-isoladores com livre acesso a água e ração. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal da UFMG (CETEA – PROTOCOLO 044/ 2004). A seguir estão detalhados os experimentos realizados.

- Experimento para coleta de tecidos: os animais foram sacrificados nos 3º, 5º e 7º dias após a infecção para análise dos sinais clínicos, parâmetros inflamatórios e titulação viral.

Quadro 1 - Animais C57BL/6 selvagens e deficientes em 5-LO (5-LO^{-/-})

Dias pós-infecção	Inóculo	C57BL/6 i.p (inflamação, sinais e sintomas clínicos e titulação)	C57BL/6 i.p (inflamação, sinais e sintomas clínicos e titulação)	5-LO ^{-/-} i.p (histologia)	5-LO ^{-/-} i.p (histologia)
5	10PFU	n = 6 sangue, baço/fígado e pulmões	n = 6 sangue, baço/fígado e pulmões	n = 4 baço/fígado e pulmões	n = 4 baço/fígado e pulmões
7	10PFU	n = 6 sangue, baço/fígado e pulmões	n = 6 sangue, baço/fígado e pulmões	n = 4 baço/fígado e pulmões	n = 4 baço/fígado e pulmões

Fonte: elaborado pelo autor.

Quadro 2 - Animais C57BL/6 selvagens e deficientes em SOCS-2 (SOCS-2 ^{-/-})

Dias pós- infecção	Inóculo	C57BL/6	C57BL/6	SOCS-2 ^{-/-}	SOCS-2 ^{-/-}
		i.p (inflamação, sinais e sintomas clínicos e titulação)	i.p (inflamação, sinais e sintomas clínicos e titulação)	i.p (histologia)	i.p (histologia)
5	10PFU	n = 6 sangue, baço/fígado e pulmões	n = 6 sangue, baço/fígado e pulmões	n = 4 baço/fígado e pulmões	n = 4 baço/fígado e pulmões
7	10PFU	n = 6 sangue, baço/fígado e pulmões	n = 6 sangue, baço/fígado e pulmões	n = 4 baço/fígado e pulmões	n = 4 baço/fígado e pulmões

Fonte: elaborado pelo autor.

4.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

Para a dosagem de citocinas, fragmentos de pulmão, baço e fígado foram homogeneizados em PBS contendo inibidor de proteases (0,1 mM de fenilmetilsulfonyl fluoreto, 0,1 mM de cloreto de benzetonio, 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% de Tween 20, na proporção de 0,1 g de tecido para cada 1 mL de solução. Utilizou-se um triturador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). O sobrenadante foi utilizado para as dosagens, após centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). O soro foi obtido do sangue total (15 minutos a 37°C seguidos de 30 minutos a 4°C) por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos e posteriormente armazenado a -20°C até análise posterior.

As amostras de soro, pulmão e baço foram analisadas na diluição 1:3 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina, enquanto as amostras de fígado foram analisadas na diluição 1:5.

Os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-6, CXCL1 (KC) foram medidos nos tecidos dos animais, conforme descrito por SOUZA *et al.*, (2009), utilizando kits de anticorpos adquiridos do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo recomendado, resumidamente descrito a seguir.

Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, e a sensibilização ocorreu durante 18 horas a 4° C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma). A detecção foi realizada pela incubação com estreptoavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingem - 1:4000) e revelada com o substrato OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride - Sigma). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com H₂SO₄ a 1M.

A leitura foi realizada no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm. Os ensaios apresentam uma sensibilidade de 8-16 pg/mL.

4.4 DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi obtida pelos ensaios de atividade da mieloperoxidase (MPO) conforme descrito anteriormente (MATOS *et al.*, 1999).

Sumariamente, fragmentos de tecido dos animais infectados ou controles foram removidos e congelados a -20°C. Após o descongelamento, o tecido (1 g de tecido em 19 mL de tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA), utilizando um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA), e centrifugado a 3000 x g por 15 minutos (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). O precipitado foi submetido à lise hipotônica (15 mL de solução de NaCl 0,2%, seguido da adição de um volume igual de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após).

Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão Na₃PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadecyltrimethylammonium (HTAB) 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 3000 x g, e os sobrenadantes foram recolhidos. As amostras dos tecidos foram diluídas previamente à análise em tampão Na₃PO₄ 0,05 M na razão de 1:10.

A atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuspensionado foi calculada pela

medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados foram expressos como o número total de neutrófilos acompanhado da OD do sobrenadante do tecido e comparados com neutrófilos da cavidade peritoneal igualmente processados. Para tanto, a indução de neutrófilos na cavidade peritoneal foi realizada pela injeção de 3 mL de caseína a 5%.

Uma curva padrão do número de neutrófilos versus OD foi obtida previamente pelo processamento de neutrófilos purificados (>95% de pureza), conforme descrito anteriormente, e foi utilizada para a medição da atividade da mieloperoxidase.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE PLAQUETAS CIRCULANTES

No momento do sacrifício dos animais, foram coletados 200µL de sangue heparinizado para a quantificação de plaquetas por meio de um ensaio manual de contagem. O procedimento envolveu a diluição de 10µL do sangue heparinizado em 990µL de uma solução a 1% de oxalato de amônio em água Milli-Q, promovendo a lise de todas as células sanguíneas, exceto as plaquetas. Após uma vigorosa vortexação e incubação à temperatura ambiente por 20 minutos, a solução foi novamente vortexada e 10µL dessa solução foram carregados na câmara de Neubauer. A câmara foi então levada ao microscópio óptico de objetiva invertida para a contagem das plaquetas. O valor obtido pela contagem de um dos retículos do quadrante interno da câmara foi multiplicado por 25.000 (25 retículos x 100 [diluição] x 10 [fator de correção da câmara]) para obter o valor de plaquetas circulantes (plaquetas por mm³ de sangue).

4.6 ANÁLISES DO ÍNDICE DE HEMATÓCRITO

Uma pequena amostra de sangue de cada animal foi retirada por meio de um capilar de vidro, o qual foi centrifugado em uma centrífuga de microhematócrito por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada uma proporção entre o comprimento das porções vermelha (concentração de elementos do sangue) e branca (concentração de plasma), utilizando uma regra de três simples:

Branco + Vermelho	-----	100%
Vermelho	-----	X

Os resultados foram expressos em percentagem, sendo que valores mais elevados indicam maior concentração de hemácias no sangue.

4.7 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Após a infecção, os animais foram sacrificados e os órgãos (baço, fígado e pulmões) foram coletados. Os órgãos foram fixados em formol tamponado a 10% em PBS por 18 horas e, em seguida, em álcool 70%, até o processamento das amostras. Para o processamento, os tecidos foram submetidos a passagens sequenciais em etanol em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 minutos cada) e em parafina líquida (Paraplast Sigma; 1 e 2 – 30 minutos). Esses tecidos foram incluídos em blocos de parafina. Cortes de 5 micrômetros (μm) de espessura foram dispostos em lâminas de microscopia. Após essa fase, as lâminas foram desparafinizadas (xilol 20 minutos; álcool absoluto, 90%, 80% e 70% - 5 imersões; água). As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de Hematoxilina de Harris (20 segundos) e Eosina (8 segundos). Em seguida, ocorreu a desidratação (álcool 70, 80, 90% e absoluto 1 e 2 – 5 imersões; xilol 1 e 2 – 5 imersões) e a montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá sintético.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão para cada grupo de 6 animais. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t não paramétrico ou a análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), seguida por comparações múltiplas de Newman-Keuls. O software utilizado para análise foi o GraphPad PRISM, GraphPad Software Inc. (San Diego, CA, USA). Os níveis de significância foram estabelecidos em $p < 0,05$.

4.9 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

A pesquisa bibliográfica e a obtenção de artigos em formato eletrônico foram feitas através da base de dados do portal Medline/Pubmed, no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>.

A obtenção de artigos em formato eletrônico também foi realizada através da base de dados do portal Periódicos Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes/Mec), no endereço: <http://www.periodicos.capes.gov.br/portugues/index.jsp>.

O site do ICTVdB: The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses foi utilizado para pesquisa no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>.

Foram avaliados artigos originais, de revisão ou atualização e capítulos de livros-texto, conforme sua relevância para o tema de estudo, escritos em português e inglês.

As palavras-chaves utilizadas foram: “Dengue vírus, Dengue infection, inflammation, immunopathogenesis of DEN infection, Dengue fever, Dengue hemorrhagic fever, 5-LO, lipoxins, resolution, SOCS, SOCS-2, SOCS infection, SOCS viral infection, SOCS innate immunity”.

5 RESULTADOS

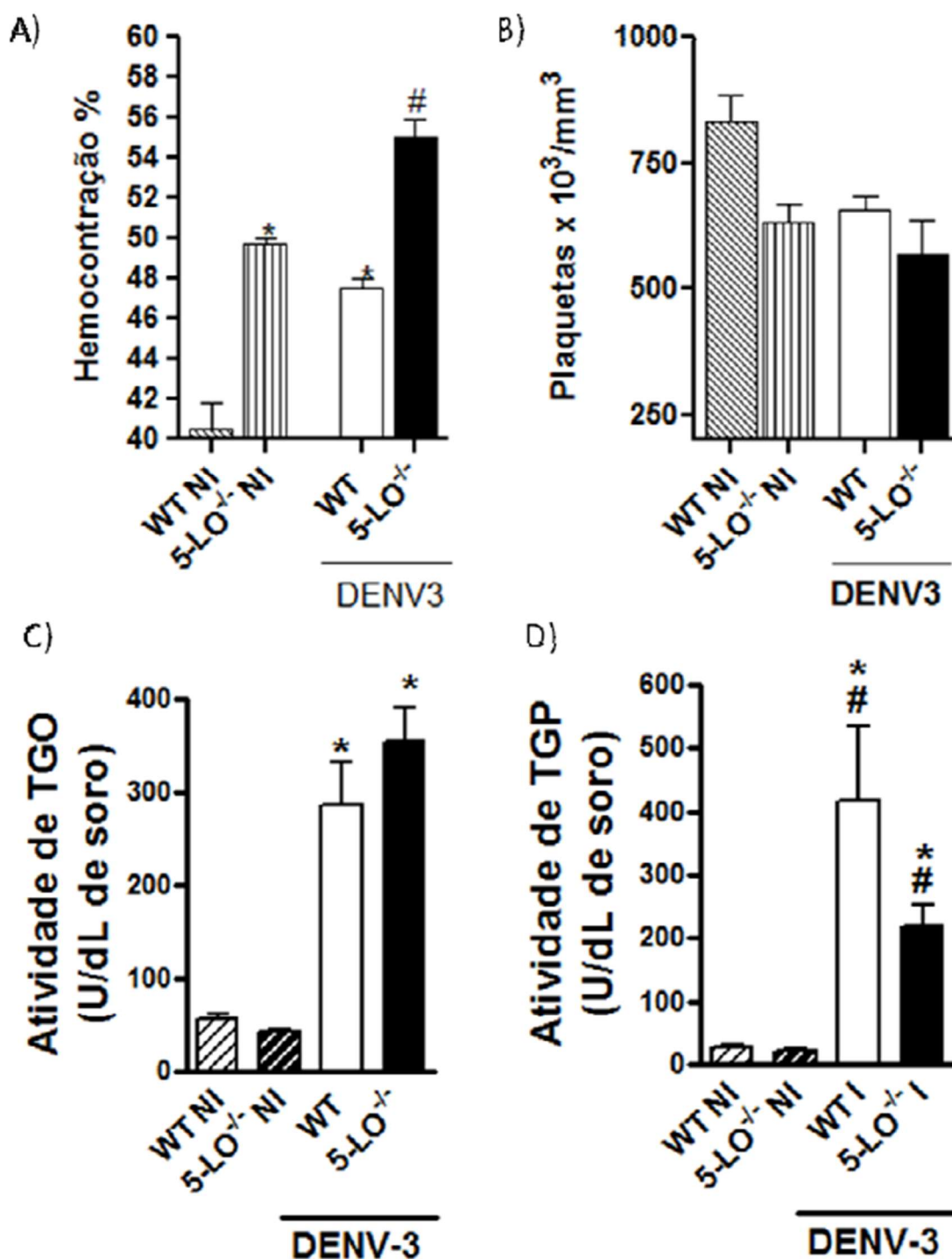
A ausência da 5-Lipoxigenase tem um impacto em nosso modelo experimental de infecção pelo DENV-3?

5.1 ANIMAIS 5-LO^{-/-} NÃO APRESENTAM MUDANÇAS SIGNIFICATIVAS NO QUADRO CLÍNICO DA INFECÇÃO PELO DENGUE.

Nosso primeiro passo foi avaliar a participação da 5-lipoxigenase (5-LO) nas alterações hematológicas após a infecção por DENV-3. A ocorrência dessas alterações foi avaliada no 7º dia após a infecção. Os animais WT e 5-LO^{-/-} infectados apresentaram aumento do nível de hematócrito em comparação com seus respectivos controles não infectados (Figura 8-A), não havendo diferença significativa entre os grupos WT e 5-LO^{-/-} infectados. No entanto, ao observar que os animais 5-LO^{-/-} não infectados já apresentam uma hemoconcentração mais elevada em comparação com os animais WT não infectados, podemos concluir que a diferença entre os mutantes e os selvagens não é significativa e sim devida a uma diferença fundamental causada pela mutação. Na Figura 8-B, podemos observar a plaquetopenia durante a infecção, mas não há diferenças entre animais WT e 5-LO^{-/-}. Vale a pena notar mais uma vez que os mutantes não infectados apresentam um número de plaquetas circulantes relativamente inferior ao dos animais selvagens não infectados.

Na Figura 8-C e D, observa-se que existe um aumento considerável na atividade das transaminases hepáticas nos animais infectados pelo DENV3, mas, mais uma vez, não se observa uma diferença significativa entre WT e 5-LO^{-/-} infectados.

Figura 8 - Alterações hematológicas e nos níveis de transaminases hepáticas desencadeadas pela infecção pelo DENV-3 em camundongos WT e 5-LO^{-/-}



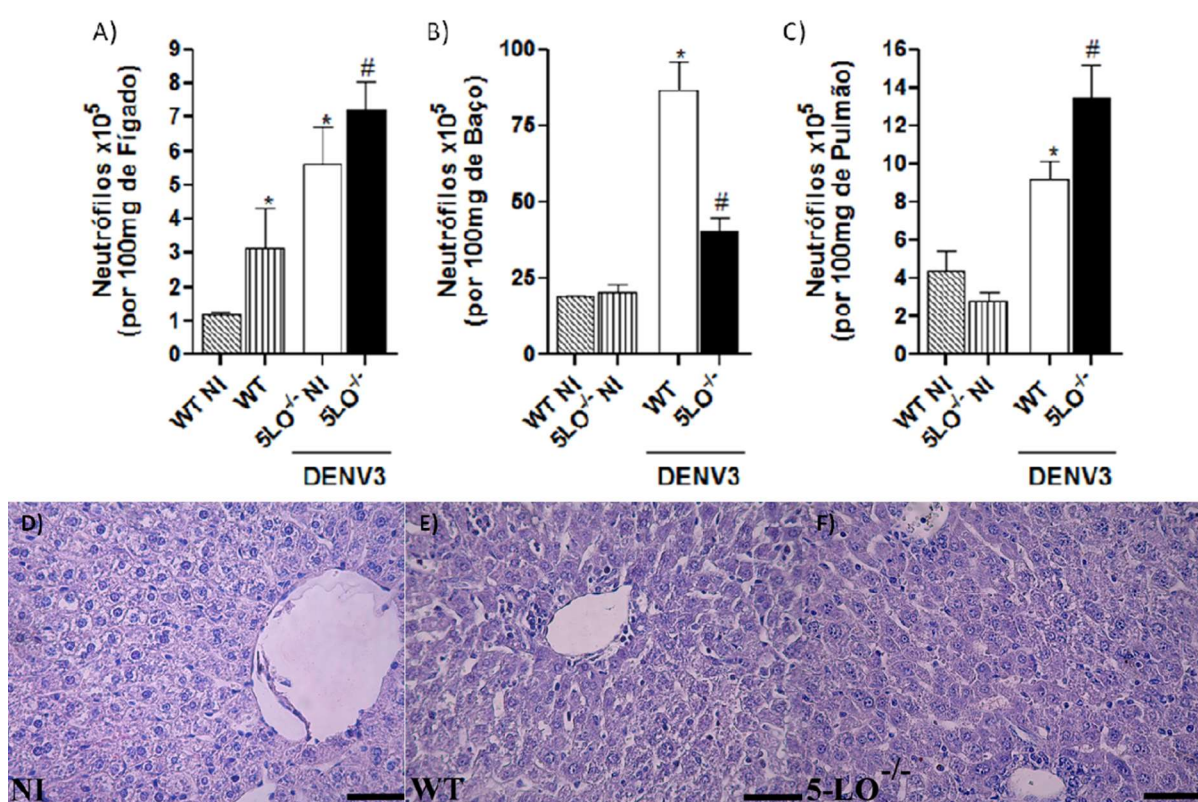
Camundongos WT e 5-LO^{-/-} foram infectados com o DENV-3 pela injeção i.p de 10PFU/100µL em PBS. Os resultados foram expressos em porcentagem (hematócrito), em número de plaquetas por mL de sangue e Unidades por decilitro de soro. A quantificação das transaminases foi realizada por meio de Kits comerciais específicos (Bioclin/Quibasa). Os resultados são apresentados como TGO/TGP U/mL e representam a média ± EPM de 5-6 animais por grupo. * p < 0,05, quando comparado com animais NI. # p < 0.05 quando comparados os animais WT e 5-LO^{-/-} no 7º dia de infecção.

Fonte: elaborada pelo autor.

A ausência da 5-Lipoxigenase influencia na liberação de citocinas e quimiocinas desencadeadas pela infecção pelo DENV-3?

5.2 ANIMAIS 5-LO^{-/-} NÃO APRESENTARAM DIFERENÇAS MARCANTES NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS CARACTERÍSTICAS NA RESPOSTA CONTRA O DENV-3.

Figura 9 - Acúmulo de neutrófilos no baço, fígado e pulmões de animais WT e 5-LO^{-/-} após a infecção com o DENV-3 e análise histológica de seções do fígado de animais WT e 5-LO^{-/-}



A migração de neutrófilos (A, B e C) foi avaliada pela quantificação dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO) nos tecidos avaliados. Camundongos WT e 5-LO^{-/-} foram infectados com o DENV-3 pela injeção i.p de 10PFU/100µL em PBS, anestesiados e sacrificados para a coleta dos órgãos 7º dia após infecção. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por 100 mg de tecido ou e são média $\pm$ EPM de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$, quando comparado com animais NI. # $P < 0,05$, quando comparado aos animais WT no 7º após infecção. **D)** Animal Não-infectado (NI). **E)** WT 7º dia de infecção. **F)** 5- LO^{-/-} no 7º dia após a infecção (HE, aumento original de 20x, barras: 100µm).

5.3 ANIMAIS 5-LO^{-/-} APRESENTAM DIFERENÇAS NA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NOS TECIDOS, MAS NÃO NA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO HEPÁTICO.

A Figura 9 demonstra a quantificação da atividade da mieloperoxidase (análise indireta indicativa do número de neutrófilos) no baço (A), fígado (B) e pulmões (C) dos

animais WT e 5-LO^{-/-} infectados com o DENV-3 no 7º dia após a infecção. Podemos notar que no fígado e no pulmão dos animais 5-LO^{-/-} infectados, existe um aumento no acúmulo de neutrófilos quando comparados aos animais WT. Nas Figuras 10-D, E e F, temos a análise histológica do fígado dos animais infectados. Em D, temos o corte de um animal não infectado, onde podem ser visualizados a integridade da arquitetura lobular do órgão, os hepatócitos, capilares sinusóides e a veia central sem alterações. Já em E, no 7º dia após a infecção, há o comprometimento generalizado do órgão em questão, evidenciado pela presença de infiltrado celular (PMN), vacuolização dos hepatócitos e áreas localizadas de morte celular. A Figura 9-F representa o animal 5-LO^{-/-} infectado pelo DENV-3 no sétimo dia após infecção, e podemos observar o mesmo quadro de comprometimento tecidual que vemos em E, porém, sem diferenças quando comparamos os dois, WT com 5-LO^{-/-}.

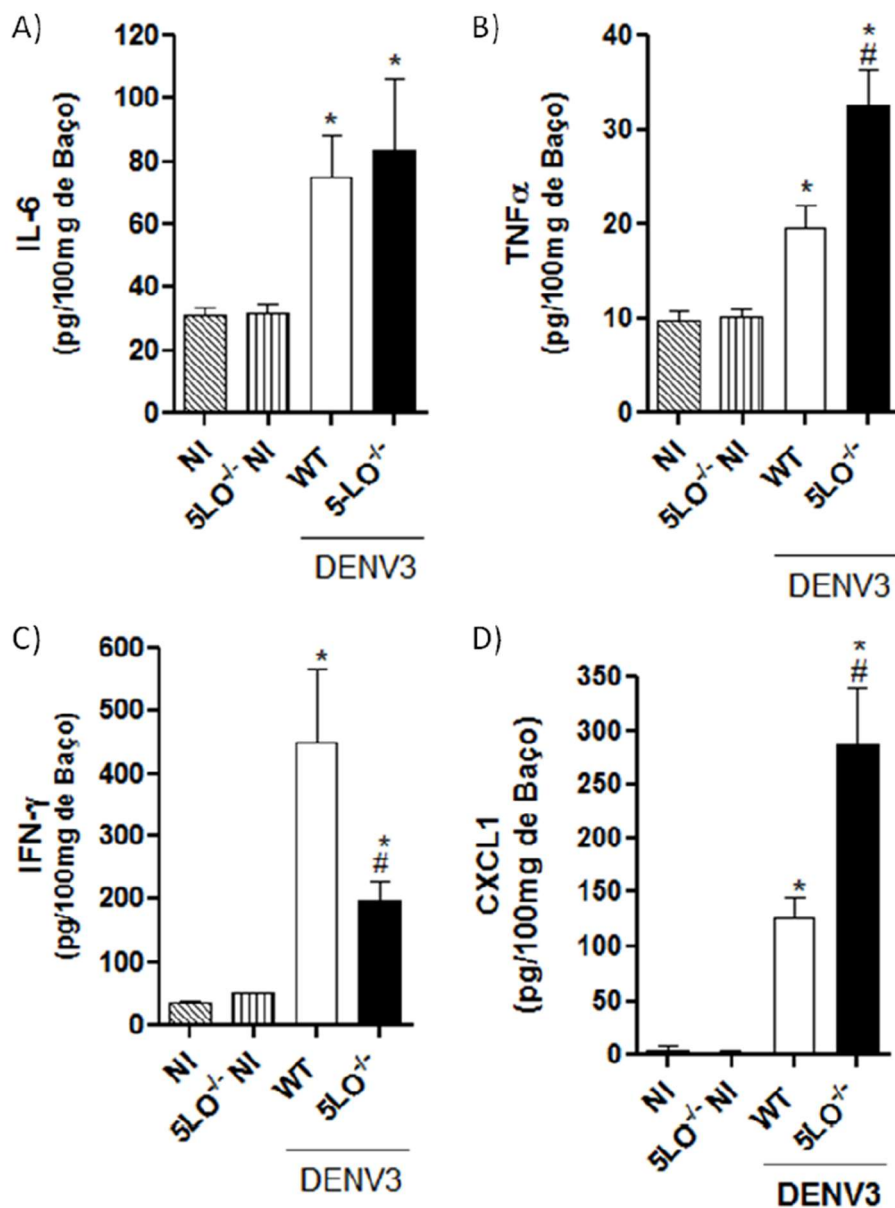
A ausência da 5-Lipoxigenase influencia na liberação de citocinas e quimiocinas desencadeadas pela infecção pelo DENV-3?

5.4 ANIMAIS 5-LO^{-/-} NÃO APRESENTARAM DIFERENÇAS MARCANTES NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS CARACTERÍSTICAS NA RESPOSTA CONTRA O DENV-3.

Os níveis de TNF- α , IL-6 e IFN- γ foram quantificados no baço, no fígado e no soro de animais WT e 5-LO^{-/-} no 7º dia após a infecção. As Figuras 10 (A, B e C), 11 (A, B e C) e 12 (A, B e C) demonstram que, no 7º dia após a infecção, os níveis de IL-6, TNF- α e IFN- γ estão aumentados no baço, fígado e soro dos animais infectados em relação aos animais não infectados. No entanto, não há diferença significativa entre a produção destas citocinas nos animais 5-LO^{-/-} quando comparados com os animais WT.

As Figuras 10 (D), 11 (D) e 12 (D) mostram o aumento da produção da quimiocina CXCL-1 no baço, fígado e soro dos animais no 7º dia após a infecção. Apesar de os animais 5-LO^{-/-} apresentarem um ligeiro aumento na liberação de CXCL1, isso não parece contribuir para o progresso da doença nesses animais, como observado anteriormente pela análise histológica e pelo quadro clínico.

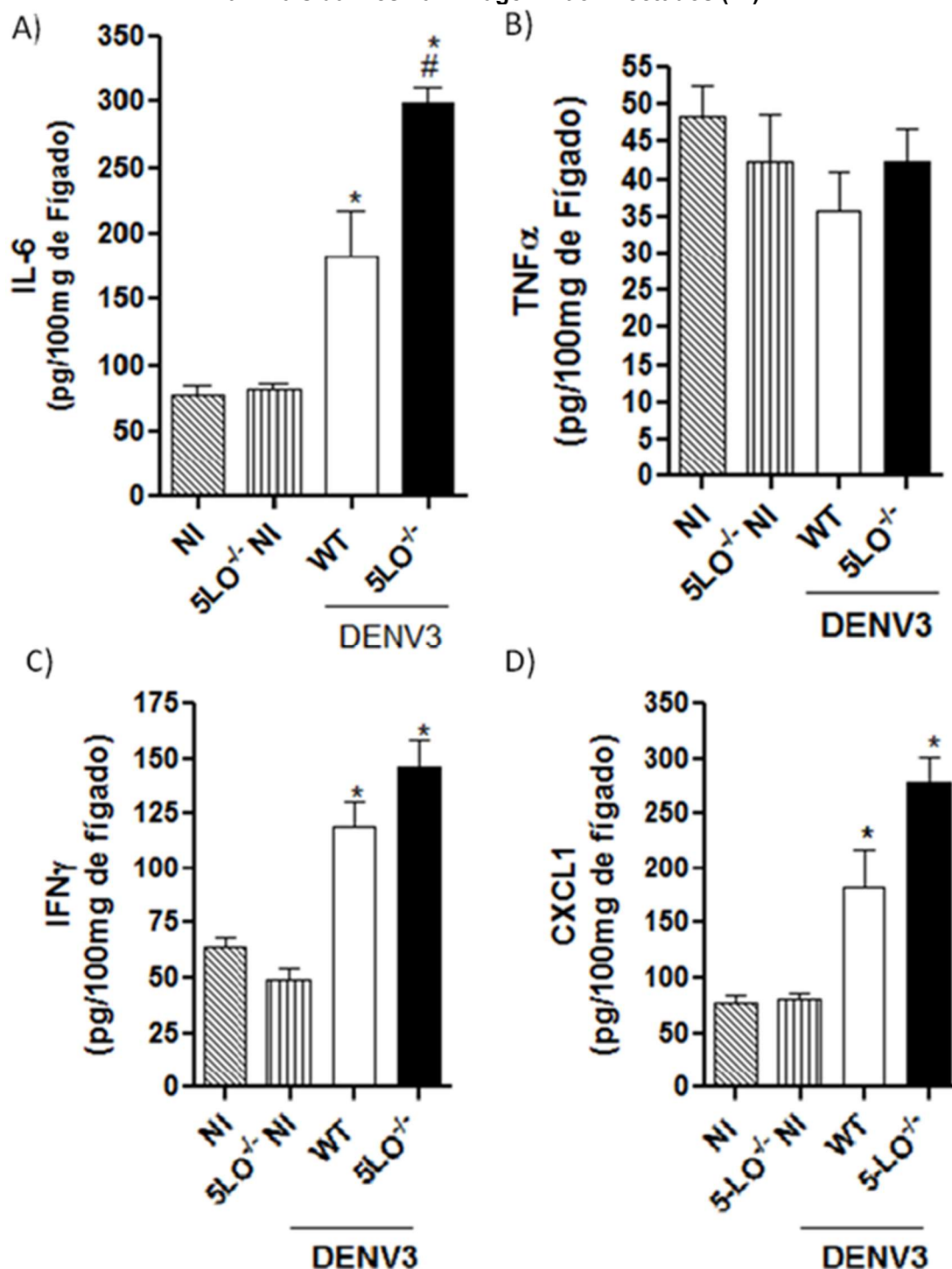
Figura 10 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no baço, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e 5-LO $^{-/-}$ comparados com animais da mesma linhagem não infectados (NI)



IL-6, TNF- α , IFN- γ e CXCL1 foram quantificadas por ELISA no baço (Figuras A, B, C e D respectivamente) desses animais. Os Camundongos WT e 5-LO $^{-/-}$ foram infectados com o DENV-3 pela injeção i.p de 10PFU/100 μ L em PBS, anestesiados e sacrificados para a coleta do baço no 7º dia após a infecção. Os resultados são apresentados como pg de IL-6, TNF- α , IFN- γ ou CXCL1 por 100 mg de tecido e são média $\pm$ EPM de 5-6 animais por grupo. * para $p < 0,05$, quando comparados com os animais NI e # para $p < 0,05$, quando comparados com os animais WT e 5-LO $^{-/-}$ infectados no 7º dia de infecção.

Fonte: elaborada pelo autor.

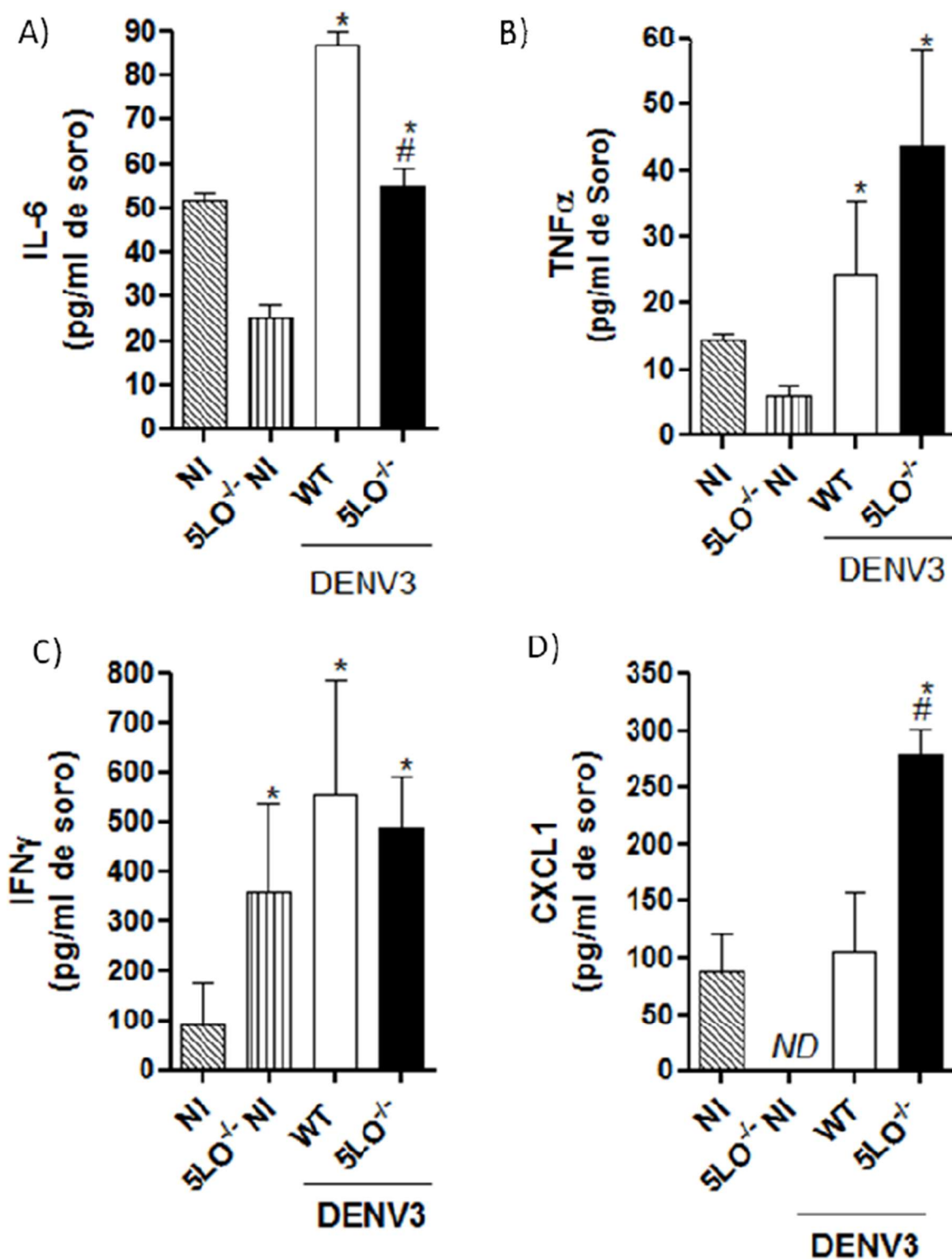
Figura 11 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no fígado, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e 5-LO $^{-/-}$ comparados com animais da mesma linhagem não infectados (NI)



IL-6, TNF- α , IFN- γ e CXCL1 foram quantificadas por ELISA no fígado (Figuras A, B, C e D respectivamente) desses animais. Os Camundongos WT e 5-LO $^{-/-}$ foram infectados com o DENV-3 pela injeção i.p de 10PFU/100 μ L em PBS, anestesiados e sacrificados para a coleta do fígado no 7º dia após a infecção. Os resultados são apresentados como pg de IL-6, TNF- α , IFN- γ ou CXCL1 por 100 mg de tecido e são média $\pm$ EPM de 5-6 animais por grupo. * para $p < 0,05$, quando comparados com os animais NI e # para $p < 0,05$, quando comparados com os animais WT infectados no 7º dia de infecção.

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 12 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no fígado, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e 5-LO $^{-/-}$ comparados com animais da mesma linhagem não infectados (NI)



IL-6, TNF- α , IFN- γ e CXCL1 foram quantificadas por ELISA no soro (Figuras A, B, C e D respectivamente) desses animais. Os Camundongos WT e 5-LO $^{-/-}$ foram infectados com o DENV-3 pela injeção i.p de 10 PFU/100 μ L em PBS, anestesiados e sacrificados para a coleta do sangue pela artéria mesentérica superior no 7º dia após a infecção. O sangue foi centrifugado a 5000rpm por 10 minutos para obtenção do soro. Os resultados são apresentados como pg de

IL-6, TNF- α , IFN- γ ou CXCL1 por ml de soro e são média $\pm$ EPM de 5-6 animais por grupo. * para $p < 0,05$, quando comparados com os animais NI e # para $p < 0,05$, quando comparados com os animais WT infectados no 7º dia de infecção.

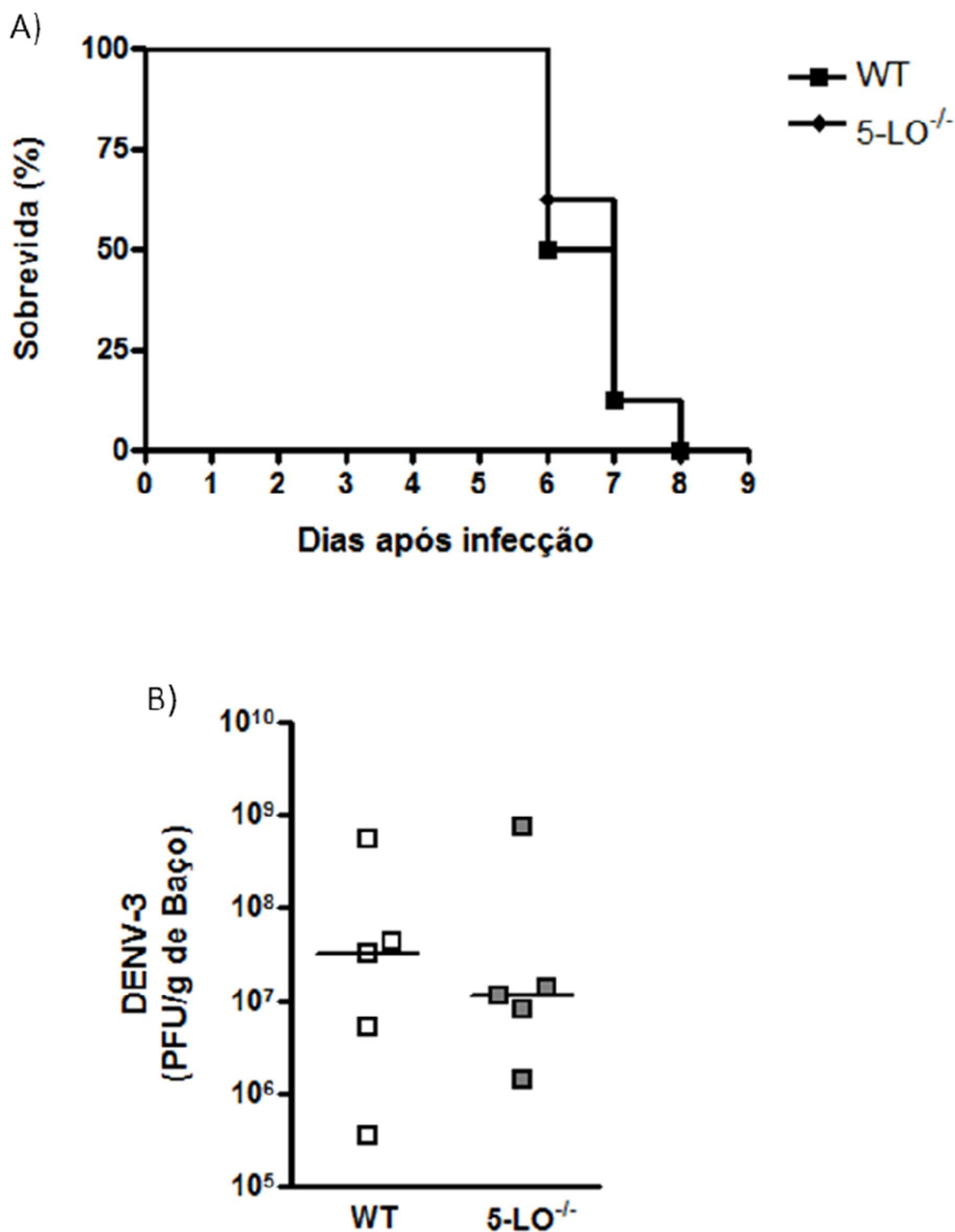
Fonte: elaborada pelo autor.

A ausência da 5-Lipoxigenase afetaria a sobrevida dos animais infectados pelo DENV-3 ou estaria envolvida no controle da replicação viral?

5.5 NÃO HOUVE DIFERENÇAS NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS 5-LO^{-/-} EM RELAÇÃO AOS ANIMAIS WT E TAMPOUCO NA CARGA VIRAL ESPLÊNICA DESSES ANIMAIS.

Como podemos observar na Figura 13-A, não houve diferenças na sobrevivência dos animais 5-LO^{-/-} infectados quando comparados aos animais WT. As curvas apresentam-se praticamente unidas ao longo dos dias após a infecção. E, como esperado pelos resultados anteriores, não há diferença no título viral esplênico dos animais 5-LO^{-/-} quando comparados com WT (Figura 13-B), o que indica que não há diferença na replicação viral destes animais, não implicando assim, a 5-LO e seus produtos no controle da infecção pelo DENV-3 no nosso modelo experimental.

Figura 13 - Taxa de letalidade induzida pela infecção de DENV-3 em camundongos WT e 5-LO^{-/-} e quantificação das unidades formadoras de placas (PFU) após infecção pelo DENV-3 no baço de animais WT e 5-LO^{-/-}



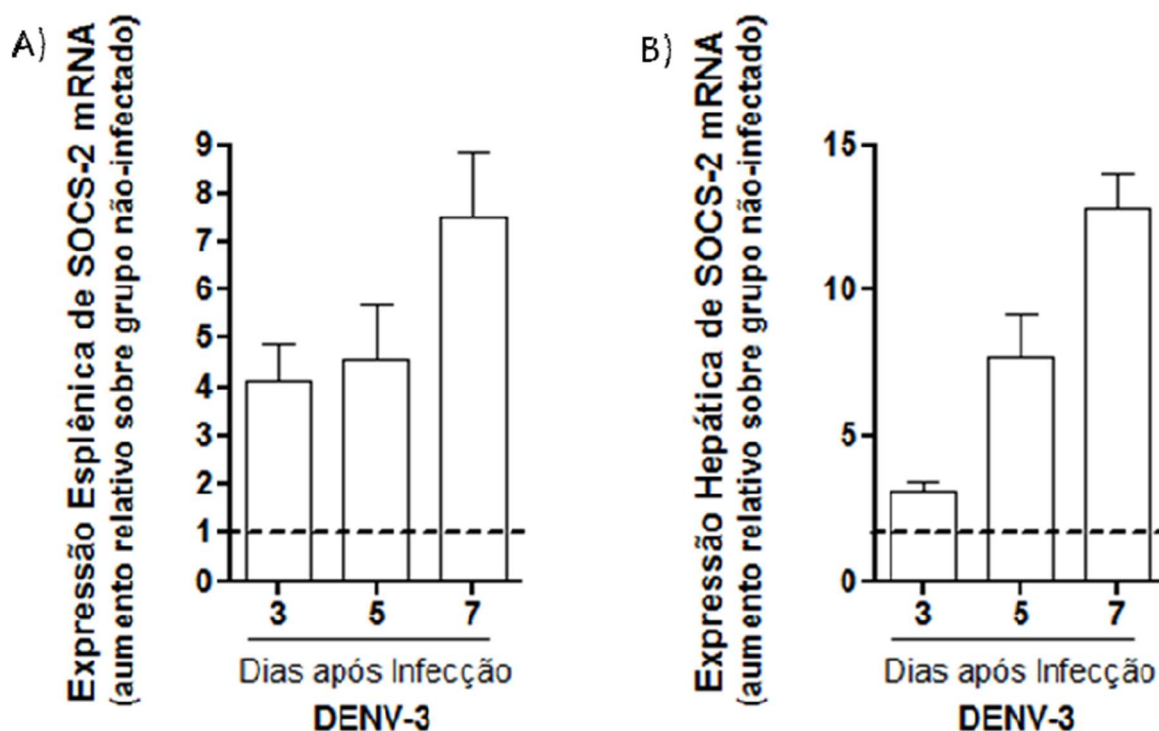
A) Camundongos WT e 5-LO^{-/-} foram infectados por injeção intraperitoneal com 10 PFU/10 μ L de PBS, em grupos de 7-8 animais. A sobrevivência dos animais foi avaliada ao longo de 14 dias após a infecção. B) Para o ensaio de quantificação das unidades formadoras de placas, animais WT e 5-LO^{-/-} foram infectados por injeção intraperitoneal com 10 PFU/100 μ L, em grupos de 5-6 animais. Os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta do baço no 7º dia após a infecção. Os dados são apresentados em um diagrama de dispersão, com a barra representando a mediana. Fonte: elaborada pelo autor.

A infecção pelo DENV-3 provoca alteração no padrão transcricional de SOCS-2 nos tecidos?

5.6 A INFECÇÃO PELO DENV-3 PROVOCA AUMENTO DA EXPRESSÃO DO MRNA PARA SOCS-2 NO BAÇO E NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS.

Conforme observado na Figura 14, a infecção pelo DENV-3 resulta em um notável aumento na expressão do RNA mensageiro para a proteína SOCS-2 tanto no baço (Figura 14-A) quanto no fígado (Figura 14-B) dos animais infectados. Este aumento parece ser gradual ao longo da infecção, visto que a expressão do mRNA para SOCS-2 é mais elevada no 7º dia após a infecção em ambos os tecidos.

Figura 14 - Expressão do RNA mensageiro para SOCS-2 no baço e no fígado de animais C57BL/6j infectados com o DENV-3



Camundongos C57BL/6j foram infectados por injeção i.p. com 10PFU/100µl de PBS. Os animais foram anestesiados e sacrificados para coleta de tecidos nos 3º, 5º e 7º dias após a infecção. O RNA total dos tecidos foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA, o qual, por sua vez, foi empregado em reações de PCR em tempo real com iniciadores específicos para SOCS-2, utilizando o reagente SYBR Green (Applied Biosystems). Os valores relativos transformados ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) foram normalizados em relação ao grupo controle negativo do experimento (animais não infectados, representados pela linha tracejada). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM de 5-6 animais por grupo.

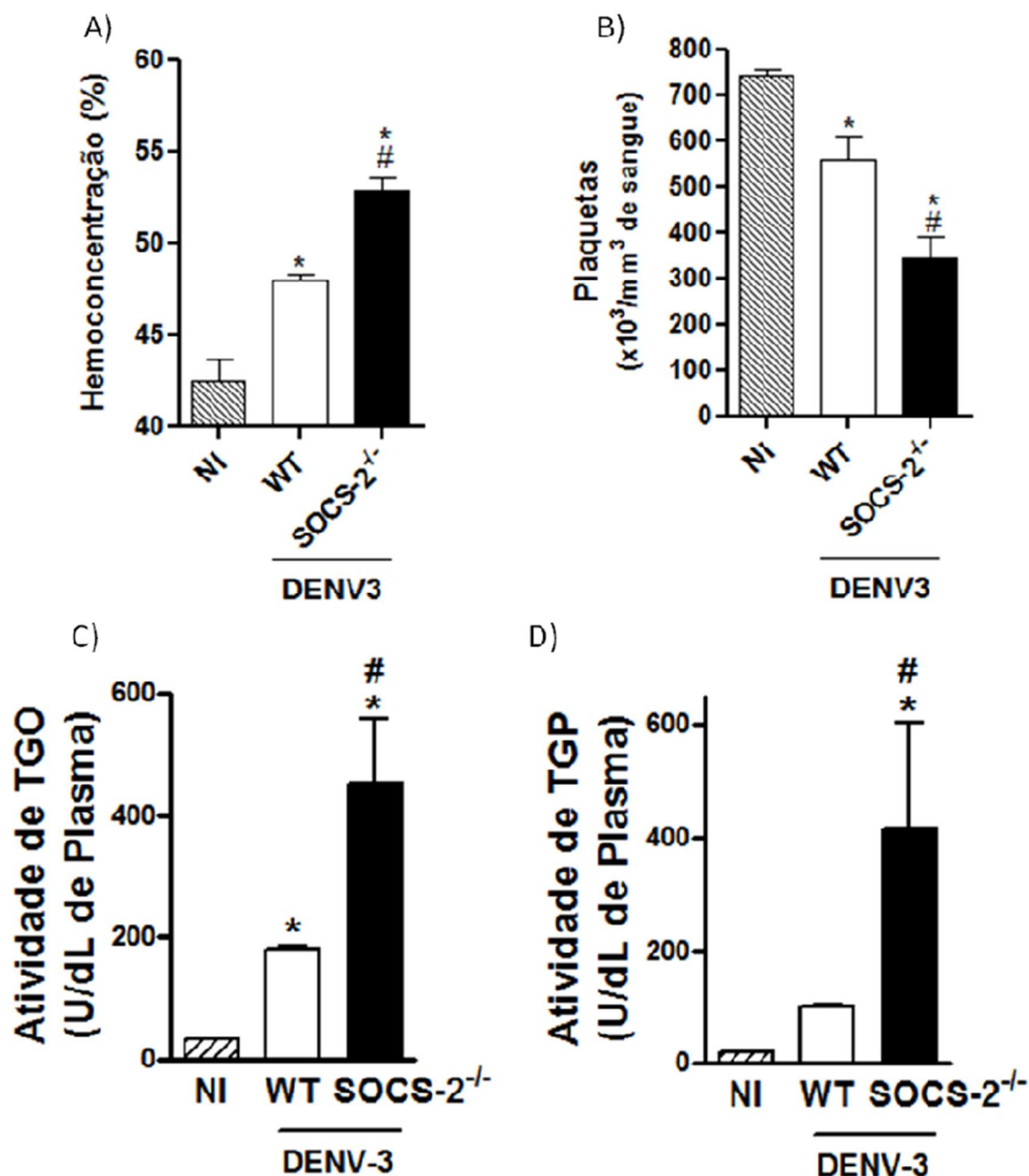
Fonte: elaborada pelo autor.

A ausência da SOCS-2 afeta o quadro clínico (hemoconcentração, número de plaquetas circulantes e atividade sérica das transaminases hepáticas) em nosso modelo experimental de infecção pelo DENV-3?

5.7 ANIMAIS DEFICIENTES NA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA SOCS-2 APRESENTAM UM AGRAVAMENTO NO QUADRO CLÍNICO EM RESPOSTA À INFECÇÃO PELO DENV-3, QUANDO COMPARADOS AOS ANIMAIS WT.

Conforme evidenciado na Figura 15, animais SOCS-2^{-/-}, em resposta à infecção pelo DENV-3, apresentam níveis elevados de hemoconcentração (Figura 16-A), plaquetopenia grave (Figura 15-B) e um aumento expressivo na atividade sérica das transaminases hepáticas (Figura 15-C e D). Esses resultados indicam uma deterioração geral nos principais sinais clínicos da infecção quando comparados aos animais WT.

Figura 15 - Alterações hematológicas e nos níveis de transaminases hepáticas desencadeadas pela infecção pelo DENV-3 em camundongos WT e SOCS-2^{-/-}



Camundongos WT e SOCS-2^{-/-} foram infectados com o DENV-3 pela injeção i.p de 10 PFU/100µL em PBS, anestesiados e sacrificados no 7º dia após a infecção para obtenção do sangue e consequente separação do soro por centrifugação. Os resultados foram expressos em porcentagem (hematócrito), em número de plaquetas por mL de sangue e Unidades por decilitro de soro. A quantificação das transaminases foi realizada através dos Kits comerciais específicos (Bioclin/Quibasa). Os resultados são apresentados como TGO/TGP U/mL e são média ± EPM de 5-6 animais por grupo. * p < 0,05, quando comparado com animais NI. # p < 0,05 quando comparado com os animais WT no 7º dia de infecção, ou vice-versa.

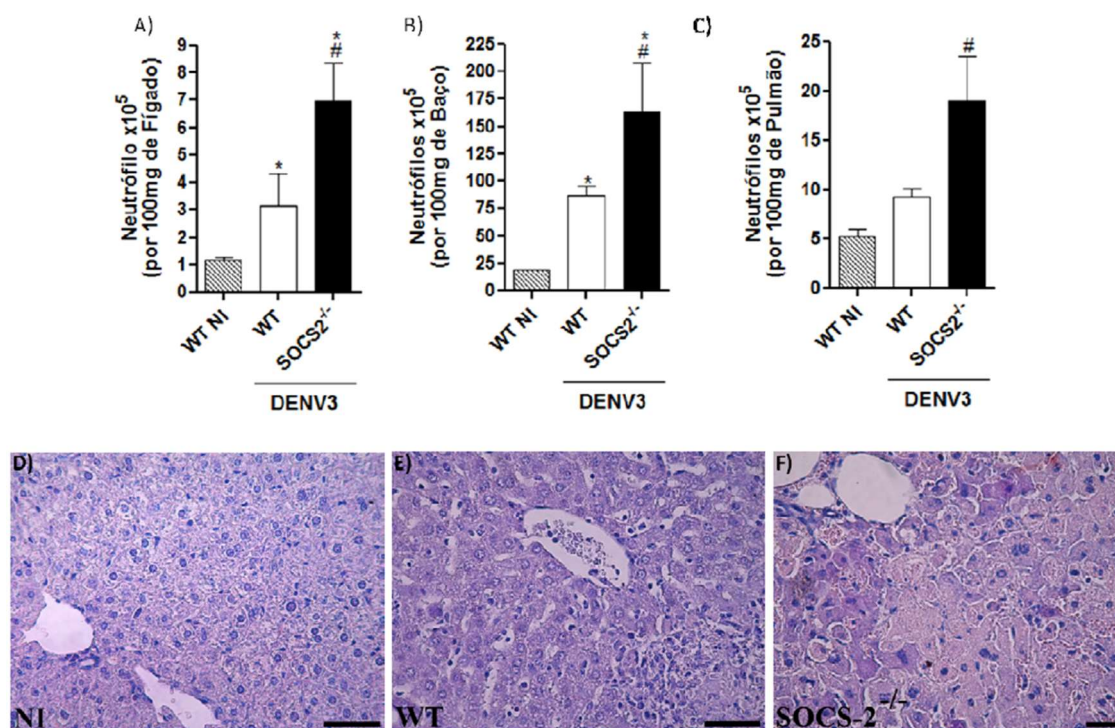
Fonte: elaborada pelo autor.

A ausência da SOCS-2 altera o infiltrado neutrofílico e no dano histológico observado durante a infecção pelo DENV-3?

5.8 ANIMAIS SOCS-2^{-/-} APRESENTAM MARCANTES DIFERENÇAS NA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE NOS TECIDOS, E AGRAVADO DANO HEPÁTICO.

Na Figura 16, observa-se um aumento expressivo no acúmulo de neutrófilos no fígado (Figura 16-A), baço (Figura 16-B) e pulmão (Figura 16-C) em animais deficientes para SOCS-2. Ao compararmos a Figura 16-E, que representa um corte histológico do fígado de um animal WT no sétimo dia após a infecção, com a Figura 16-F, que mostra um corte da mesma região do fígado de um animal SOCS-2^{-/-}, percebemos que o dano tecidual na Figura 16-F é notavelmente maior. Isso é evidenciado pela perda quase total da arquitetura do tecido, hemorragia, infiltrado celular (PMN) e morte celular.

Figura 16 - Acúmulo de neutrófilos no baço, fígado e pulmões de animais WT e SOCS-2^{-/-} após infecção com o DENV-3 e análise histológica de seções do fígado de animais WT e SOCS-2^{-/-}



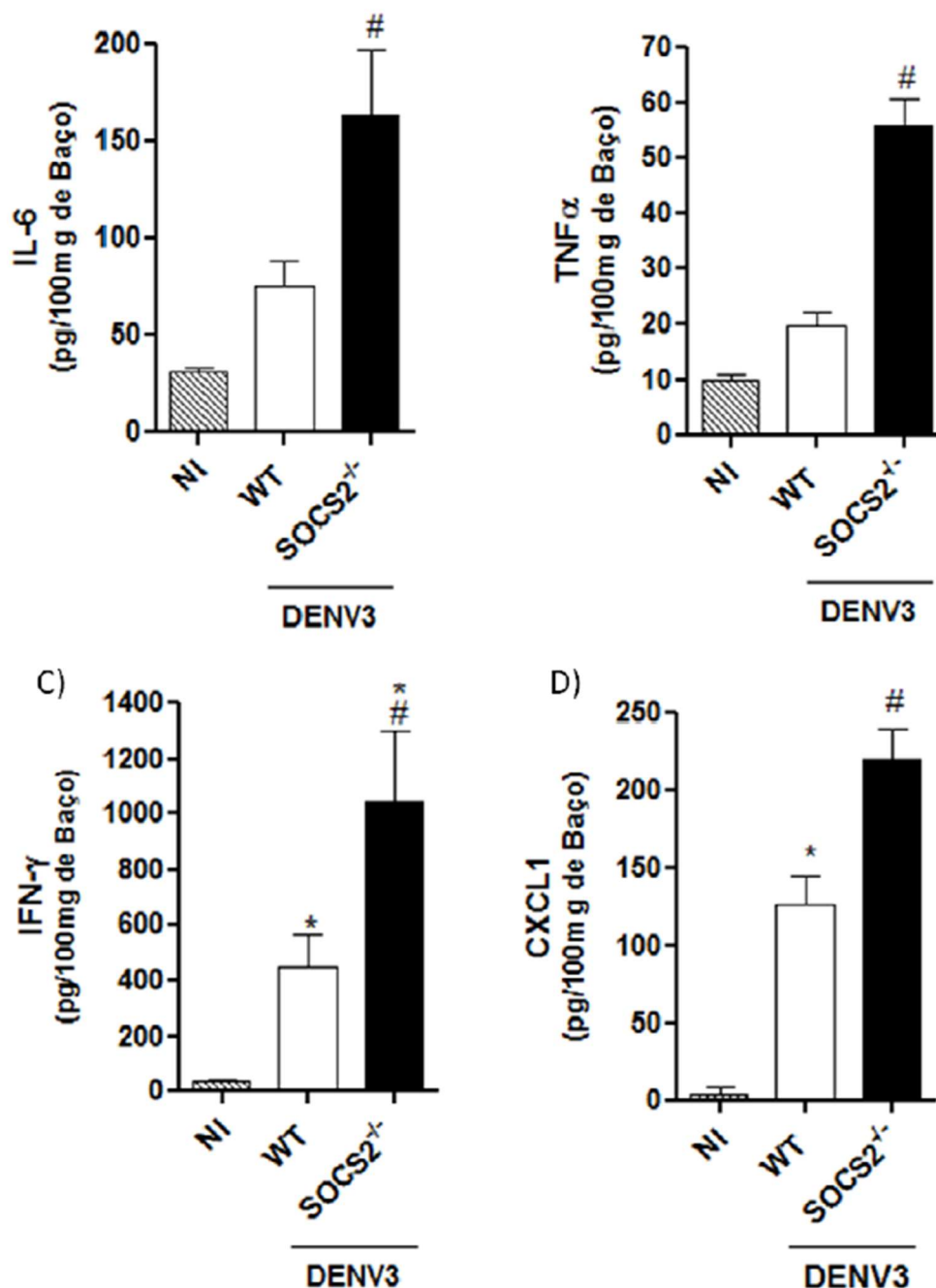
A migração de neutrófilos (A, B e C) foi avaliada pela quantificação dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO) nos tecidos avaliados. Camundongos WT e SOCS-2^{-/-} foram infectados com o DENV-3 pela injeção i.p de 10PFU/100μL em PBS, anestesiados e sacrificados para a coleta dos órgãos no 7º dia após infecção. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por 100mg de tecido ou e são média ± EPM de 5-6 animais por grupo. * p< 0,05, quando comparado com animais NI. # P<0,05, quando comparado aos animais WT no 7º dia após infecção. **D)** animal não infectado (NI). **E)** WT 7º dia de infecção. **F)** SOCS-2^{-/-} no 7º dia após a infecção (HE, aumento original de 20x, barras: 100μm).

Fonte: elaborada pelo autor/acervo do autor.

A ausência da SOCS-2 influencia a liberação de citocinas e quimiocinas desencadeadas pela infecção pelo DENV-3?

5.9 ANIMAIS SOCS-2^{-/-} APRESENTAM AUMENTO MARCANTE NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS CARACTERÍSTICAS NA RESPOSTA DENV-3.

Figura 17 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no baço, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e SOCS-2^{-/-}

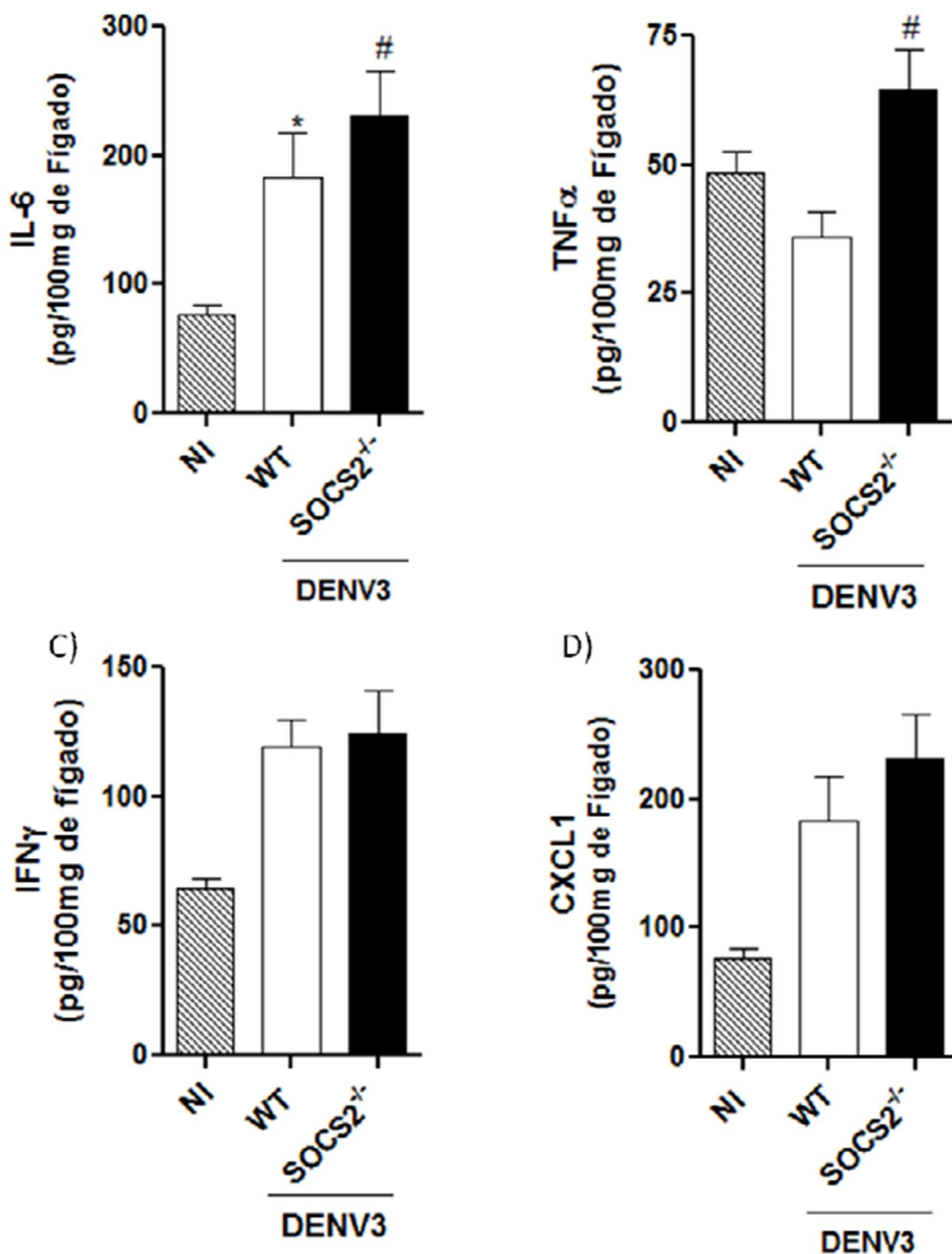


IL-6, TNF- α , IFN- γ e CXCL1 foram quantificadas por ELISA no baço (Figuras A, B, C e D respectivamente) desses animais. Os Camundongos WT e SOCS-2^{-/-} foram infectados com o DENV-3 pela injeção i.p de 10PF /100 μ L em PBS, anestesiados e sacrificados para a coleta do baço no 7º dia após a infecção. Os resultados são

apresentados como pg de IL-6, TNF- α , IFN- γ ou CXCL1 por 100 mg de tecido e são média $\pm$ EPM de 5-6 animais por grupo. * para $p < 0,05$, quando comparados com os animais NI e # para $p < 0,05$, quando comparados com os animais WT infectados no 7º dia de infecção.

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 18 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no baço, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e SOCS-2-/-

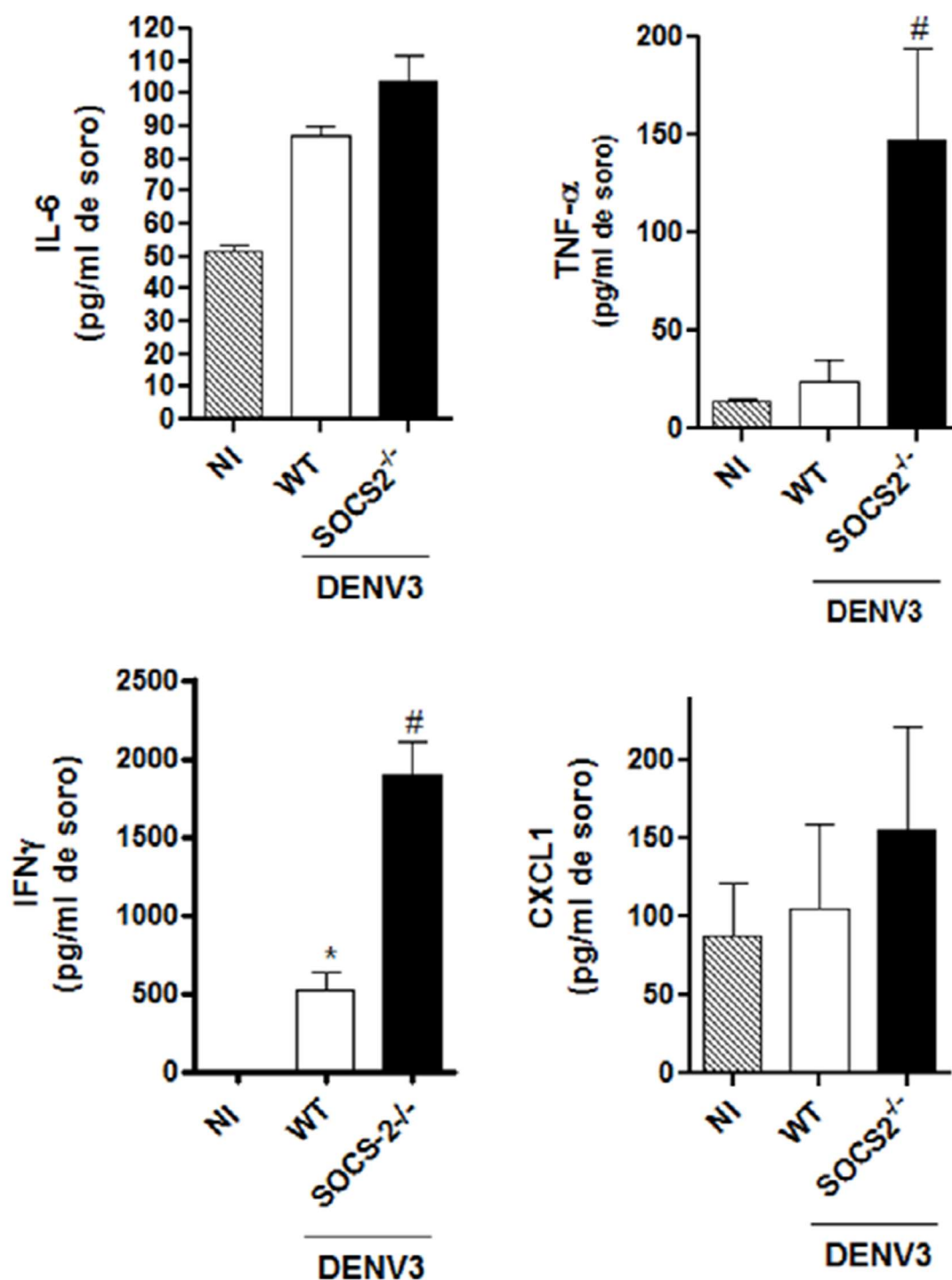


IL-6, TNF- α , IFN- γ e CXCL1 foram quantificadas por ELISA no fígado (Figuras A, B, C e D respectivamente) desses animais. Os Camundongos WT e SOCS-2^{-/-} foram infectados com o DENV-3 pela injeção i.p de 10PF /100 μ L em PBS, anestesiados e sacrificados para a coleta do baço no 7º dia após a infecção. Os resultados são apresentados como pg de IL-6, TNF- α , IFN- γ

ou CXCL1 por 100 mg de tecido e são média $\pm$ EPM de 5-6 animais por grupo. * para $p < 0,05$, quando comparados com os animais NI e # para $p < 0,05$, quando comparados com os animais WT infectados no 7º dia de infecção.

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 19 - Liberação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no soro, desencadeada pela infecção com o DENV-3 em camundongos WT e SOCS-2-/-



IL-6, TNF- α , IFN- γ e CXCL1 foram quantificadas por ELISA no soro (Figuras A, B, C e D respectivamente) desses animais. Os Camundongos WT e SOCS-2^{-/-} foram infectados com o DENV-3 pela injeção i.p de 10PF /100 μ L em PBS, anestesiados e sacrificados para a coleta do sangue pela artéria mesentérica superior no 7º dia após a infecção. O sangue foi centrifugado a 5000rpm por 10 minutos para obtenção do soro. Os resultados são apresentados como pg

de IL-6, TNF- α , IFN- γ ou CXCL1 por ml de soro e são média $\pm$ EPM de 5-6 animais por grupo.
 * para $p < 0,05$, quando comparados com os animais NI e # para $p < 0,05$, quando comparados com os animais WT infectados no 7º dia de infecção.
 Fonte: elaborada pelo autor.

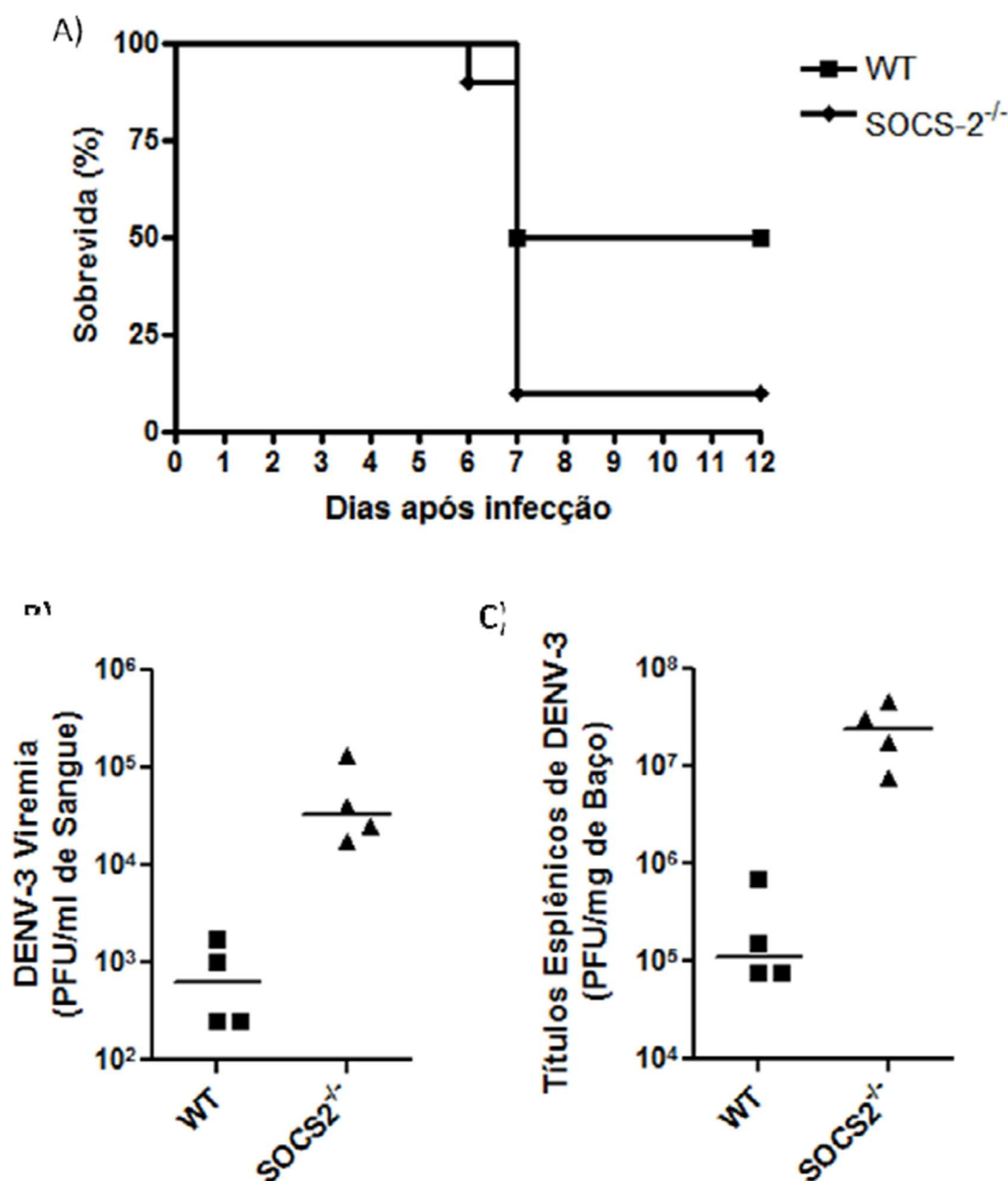
As quantidades de IL-6, TNF- α , IFN- γ e CXCL1 foram avaliadas no homogenato do baço e fígado, assim como no soro dos animais não infectados, WT e SOCS-2-/- no 7º dia após infecção pelo DENV-3. Podemos observar, na Figura 17, a liberação de IL-6, TNF- α , IFN- γ e CXCL1 no baço, onde há um aumento notável dessa liberação no tecido dos animais SOCS-2-/- quando comparados com os animais WT. O mesmo padrão é observado no fígado (Figura 18) e no soro (Figura 19) desses animais.

A ausência da SOCS-2 afetaria a sobrevivência dos animais infectados pelo DENV-3 ou estaria envolvida no controle da replicação viral?

5.10 ANIMAIS SOCS-2-/- APRESENTAM UMA TAXA DE LETALIDADE MAIOR QUANDO COMPARADOS AOS ANIMAIS WT, ALÉM DE VIREMIA ELEVADA E TÍTULOS VIRAIS ESPLÊNICOS.

Na Figura 20-A, podemos constatar um aumento de quase 50% na taxa de letalidade dos animais SOCS-2-/- em comparação com os animais WT. Além disso, como observamos nas Figuras 20-B e 20-C, a carga viral no sangue e no baço desses animais, respectivamente, é quase 1000 vezes maior do que nos animais WT.

Figura 20 - Taxa de letalidade induzida pela infecção de DENV-3 em camundongos WT e SOCS-2^{-/-} e quantificação das unidades formadoras de placas (PFU) após infecção pelo DENV-3 no baço e no sangue de animais WT e SOCS-2^{-/-}



A) Os camundongos WT e SOCS-2^{-/-} foram infectados por injeção i.p. de 10 PFU/100µl de PBS, em grupos de 7-8 animais. A sobrevivência dos animais é avaliada ao longo de 14 dias após a infecção. Os dados são apresentados na forma de uma curva de sobrevivência, em degraus. B) Para o ensaio de quantificação das unidades formadoras de placas, animais WT e SOCS-2^{-/-} foram infectados por injeção i.p. de 10 PFU/100µl, em grupos de 5-6 animais, anestesiados e sacrificados para a coleta do baço e do sangue no 7º dia após a infecção. Os dados são apresentados em um diagrama de dispersão, sendo a barra representativa da mediana.

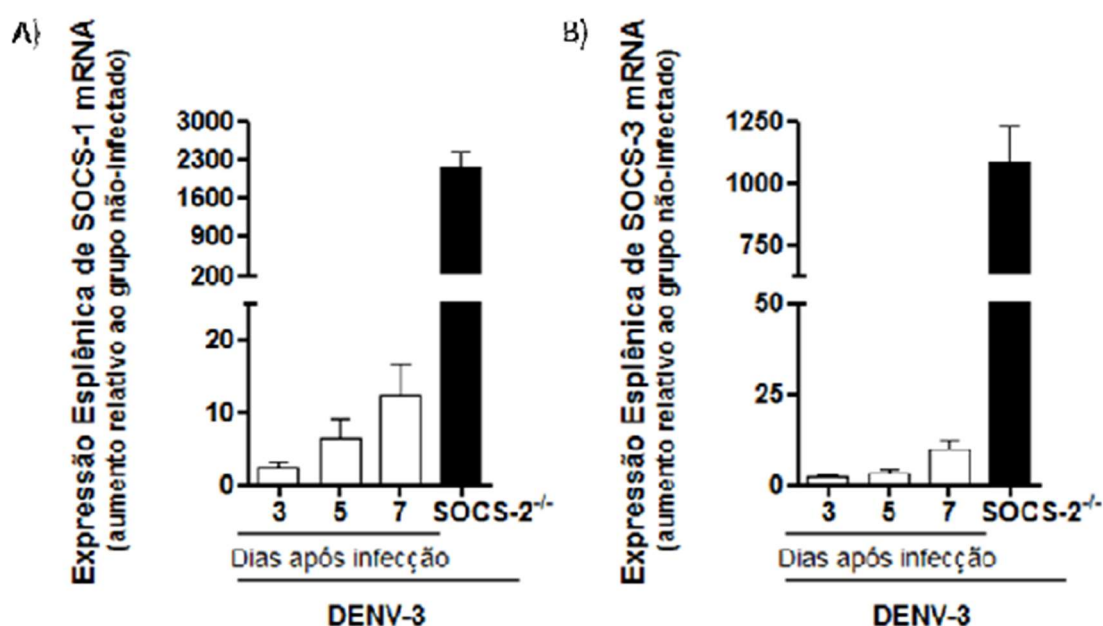
Fonte: elaborada pelo autor.

A ausência da SOCS-2 afetaria a transcrição de SOCS-1 e SOCS-3, outras duas moléculas relevantes para o controle da resposta imune?

5.11 A INFECÇÃO PELO DENV-3 INDUZ A EXPRESSÃO DE SOCS-1 E SOCS-3 NO BAÇO DOS ANIMAIS INFECTADOS. NA AUSÊNCIA DE SOCS-2, A QUANTIDADE DE TRANSCRITO PARA SOCS-1 E SOCS-3 AUMENTA EXPONENCIALMENTE NO TECIDO EM QUESTÃO.

Na Figura 21-A e B, observamos que tanto o mRNA para SOCS-1 quanto para SOCS-3 são induzidos durante a infecção pelo DENV-3, aumentando ao longo da infecção. No entanto, na ausência de SOCS-2 no sétimo dia após a infecção, a expressão de SOCS-1 e SOCS-3 sofre um aumento de mais de 2000 e 1000 vezes, respectivamente. Isso indica que a presença de SOCS-2 pode desempenhar um papel regulador sobre essas duas moléculas, que também estão envolvidas na regulação da resposta imune por meio da atenuação da sinalização por citocinas.

Figura 21 - Expressão do RNA mensageiro para SOCS-1 e SOCS-3 no baço sw animais WT e SOCS-2^{-/-} infectados com o DENV-3



Camundongos WT e SOCS-2^{-/-} foram infectados por injeção i.p. de 10 PFU/100µl de PBS, anestesiados e sacrificados para a coleta dos tecidos no 3º, 5º e 7º dias após a infecção. O RNA total dos tecidos foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O RNA total foi utilizado para a confecção do cDNA, que, por sua vez, foi utilizado na reação de PCR em tempo real com iniciadores específicos para SOCS-1 e SOCS-3, utilizando o reagente SYBR Green (Applied Biosystems). Os animais SOCS-2 representados foram sacrificados no 7º dia após a infecção. Os dados são representados como valores relativos transformados ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizados em relação ao grupo controle negativo do experimento (animais não infectados), com média $\pm$ EPM de 5-6 animais por grupo.

Fonte: elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A resposta imunológica é um vasto conjunto de eventos complexos, inter-relacionando-se de formas muitas vezes inusitadas e, por vezes, contra-intuitivas. Múltiplos sistemas, como a imunidade inata e adquirida, a hipersensibilidade imediata e tardia, além do sistema do complemento, interagem e sofrem modulação de outros sistemas, como as cascatas de coagulação e fibrinólise, o sistema nervoso autônomo e até mesmo a vicissitudes da microbiota (Tracey, 2007; Eberl, 2010). Os componentes envolvidos na resposta imunológica estão, por sua vez, organizados de maneira complexa (Petranyi, 2002), exibindo uma gama variável de respostas frente a uma multiplicidade de situações. Isso se estende para a resposta imune a agentes infecciosos. De fato, as defesas antimicrobianas do hospedeiro são numerosas e variadas, envolvendo mecanismos humorais e celulares, sejam eles inatos, adaptativos ou mesmo dispositivos biológicos que pairam na fronteira crepuscular entre essas duas condições da imunologia clássica (Eberl, 2010). Entretanto, embora seja necessária para a sobrevivência do organismo, a imunidade tem o potencial de causar lesão ao hospedeiro na constante busca pela homeostase. Isso é evidente em muitas infecções, em que a lesão tecidual e a doença podem ser causadas pela resposta do hospedeiro ao microrganismo e aos seus produtos (Deem; Hejazi, 2010). Desta forma, o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos numa doença infecciosa, quer eles causem lesão tecidual ou não, mostra-se importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ou vacinais.

No que diz respeito à infecção pelo dengue, a década passada testemunhou um grande avanço no conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resposta do hospedeiro. No entanto, apesar de todo o progresso, esse conhecimento ainda se mostra bastante incipiente (Guzman *et al.*, 2010). A busca por um mecanismo, ou conjunto deles, para explicar a manifestação da forma hemorrágica da doença continua. Apesar de termos respostas parciais, como o modelo de intensificação mediada por anticorpo, a ineficácia das medidas preventivas e terapêuticas contra a doença também persiste. No Brasil, em toda a América Latina e na Ásia, a infecção tem recebido grande atenção por parte das autoridades de saúde pública. Grandes quantidades de dinheiro e recursos humanos têm sido investidos na pesquisa e no combate à doença e seu vetor nos últimos vinte anos. No entanto, apesar de todo esse investimento, o número de casos cresceu vertiginosamente, acompanhando a

disseminação dos diferentes sorotipos virais (Rigau-Pérez, 2006; Guzman *et al.*, 2010).

Desse modo, o estudo dos mecanismos de resposta do hospedeiro durante a infecção se mostra bastante pertinente. De maneira mais específica, a patogênese da infecção pelo dengue parece estar intimamente associada à resposta imune do hospedeiro. A manifestação da FHD tem sido atribuída a fatores como a presença de anticorpos de reatividade cruzada (o fenômeno de ADE antes mencionado), ativação indesejada de células B e T, e efeitos pró-inflamatórios de citocinas (Clyde *et al.*, 2006). Assim, um melhor conhecimento dos eventos imunológicos pode fornecer informações importantes sobre a patogênese da doença.

Num cenário onde a resposta inflamatória é de grande importância, conhecer o papel de seus mediadores e compreender como o vírus interage com esses sistemas torna-se uma tarefa básica. Em 2009, nosso grupo demonstrou a importância do Fator de Ativação Plaquetária (PAF) e seu receptor na patogênese do modelo experimental utilizando o DENV adaptado, no caso, DENV-2. Também demonstramos a importância do IFN- γ e seu papel protetor no decorrer da infecção (Fagundes, 2007; Costa, 2009). No mesmo modelo, também foi revelada a participação do sistema de quimiocinas, especificamente os receptores CCR1, CCR2 e CCR4 no desenvolvimento da doença (Guabiraba *et al.*, 2010). Este modelo é o único que utiliza animais imunocompetentes para a infecção. Os outros modelos são baseados em animais com alguma deficiência chave para favorecer a replicação viral, como o modelo no animal AG129, deficiente para os receptores de IFN do tipo I e do tipo II, infecção em quimeras camundongo/humano, e mesmo o já obsoleto modelo de infecção intra-cerebral do vírus, causando uma encefalite induzida por DENV que em nada se assemelha à doença humana (Yauch; Shresta, 2008).

Apesar de toda a controvérsia sobre os diversos mecanismos de patogênese da doença, seja a forma branda ou a forma grave, em um ponto todos concordam: imunopatogênese.

Nesse contexto, partimos para estudar o possível envolvimento da enzima 5-lipoxigenase numa perspectiva dual: o possível papel no estabelecimento de um estado pró-inflamatório, com a participação de um dos produtos de seu metabolismo, o leucotrieno B₄, um importante mediador lipídico na resposta inflamatória devido ao seu papel como ativador e facilitador do recrutamento e da migração leucocitária (Evans *et al.*, 2007; Shimizu, 2009). Além disso, investigamos a possível importância

da lipoxina A4, também um de seus produtos e fortemente implicada na modulação da resposta imune, atenuação e resolução da inflamação durante infecções (Machado; Aliberti, 2008). Utilizar animais deficientes para a 5-LO, a princípio, nos permitiria analisar se essa deficiência alteraria o delicado equilíbrio da resposta do hospedeiro. A partir dos resultados encontrados, poderíamos buscar um destes ramos, ou mesmo ambos, como participantes do desencadeamento da resposta inflamatória intensa que leva ao acometimento sistêmico, sobretudo ao choque, ou do sucesso da resposta do hospedeiro frente à infecção e ao caminho da resolução inflamatória e retorno à homeostase.

Conforme observado na Figura 9, não houve uma alteração significativa nos parâmetros clínicos, como hemoconcentração, plaquetopenia e atividade sérica das transaminases hepáticas. Isso indica que não houve agravamento da patologia, nem mesmo proteção frente à infecção na ausência da 5-lipoxigenase.

O leucotrieno B4 desempenha um papel crucial no processo de transmigração de leucócitos, estimulando a ativação celular e induzindo a expressão de moléculas de adesão tanto em leucócitos quanto nas células do endotélio vascular e no parênquima dos tecidos (Evans *et al.*, 2007; Shimizu, 2009). Na Figura 10, observamos um aumento no acúmulo de neutrófilos no fígado e no pulmão, enquanto ocorre uma redução desse acúmulo no baço. Além disso, não parecem haver diferenças no dano tecidual revelado pela análise histológica do tecido hepático entre animais WT e 5-LO^{-/-} infectados. Relembrando o papel dual da 5-LO nesse eixo inflamação/regulação da inflamação, podemos inferir que a ativação desses neutrófilos pode estar comprometida. Isso é sugerido pelo aumento das células provenientes do fígado, sem diferenças evidentes no tecido hepático pela análise histológica, enquanto ao mesmo tempo, há uma redução no acúmulo dessas células no baço. A lipoxina também desempenha um papel importante no clearance dos neutrófilos no tecido, participando da indução de sua apoptose e, consequentemente, fagocitose pelos macrófagos (Serhan, 2008). Portanto, a ausência do leucotrieno poderia explicar uma ativação comprometida, enquanto a ausência da lipoxina poderia resultar numa limpeza deficiente desses tecidos, contribuindo para o quadro que observamos.

Quanto à liberação de citocinas nos tecidos estudados e no soro dos animais deficientes para a 5-LO, observamos um aumento na liberação da quimiocina CXCL1, um importante fator para o recrutamento de neutrófilos nos tecidos (Russo *et al.*,

2010). Isso pode ser explicado de duas maneiras: como um mecanismo compensatório pela ausência do leucotrieno B₄ e, talvez mais pertinente, pela ausência da atividade imunorreguladora da lipoxina.

Assim, apesar de a 5-LO ser uma enzima chave no equilíbrio entre a indução e o controle da resposta inflamatória, não há uma alteração significativa na resposta frente à infecção pelo DENV, justamente porque desempenha esse papel duplo, perdendo tanto o eixo pró-inflamatório (LTB₄) quanto o anti-inflamatório (LXA₄).

No entanto, é muito interessante notar que, ao investigarmos um possível envolvimento da lipoxina e de seus mecanismos regulatórios em nosso modelo experimental, utilizamos animais deficientes para a proteína SOCS-2. Apesar de ter sido recentemente associada à efetivação da atenuação da resposta inflamatória mediada por lipoxina (Machado *et al.*, 2006), a literatura da última década revela um papel extremamente pleiotrópico para a molécula SOCS-2. Parece estar associada à regulação de uma série de sistemas biológicos ligados à sinalização pela via de JAK-STAT. SOCS-2 está envolvida na regulação da sinalização dos hormônios GH e IGF-1, no desenvolvimento e diferenciação do tecido neural e na diferenciação de células mesenquimais para osteoblastos (Rico-Batista *et al.*, 2007; Piessevaux *et al.*, 2008).

Na Figura 14, observamos um aumento notável da expressão de SOCS-2 durante a infecção pelo DENV. Na Figura 15, notamos que, nos animais deficientes para SOCS-2, todos os parâmetros clínicos da doença estão gravemente agravados. Como mencionado anteriormente, Machado e colaboradores demonstraram que SOCS-2 seria de fundamental importância para o controle da resposta inflamatória mediada por LXA durante uma infecção. Na ausência de SOCS-2, em um cenário patológico onde a LXA desempenhasse um papel regulador, limitando o dano tecidual e a resposta inflamatória sistêmica, teríamos então um agravamento da patologia pela falta de regulação da resposta imune.

Nossos dados corroboram com a hipótese de que este pode ser um mecanismo regulatório na infecção pelo DENV. Além dos parâmetros clínicos, na Figura 17, podemos observar que o acúmulo de neutrófilos nos tecidos dos animais SOCS-2^{-/-} é consideravelmente maior do que nos animais WT, e a destruição tecidual é muito mais grave, como podemos ver pela análise histológica. Isso parece indicar que SOCS-2 pode ter um papel importante no controle da atividade de neutrófilos. Além disso, na ausência de SOCS-2, observamos um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , nos tecidos analisados quando comparados com os

animais WT.

Em um caminho paralelo, no que diz respeito à regulação da resposta imune, as proteínas da família SOCS parecem desempenhar papéis múltiplos e de grande importância como reguladoras das vias de sinalização controladas por JAK-STAT. Uma miríade de efetores biológicos desencadeia seus efeitos através desta via de sinalização. Falando da resposta ao DENV e da exacerbação da inflamação, a importância das citocinas é bastante evidente, e é justamente através deste sistema JAK-STAT que a grande maioria destas moléculas desempenha suas funções.

Vimos anteriormente que a sinalização via JAK-STAT, além de causar a transcrição de seus efetores, também induz a expressão de seus reguladores, as SOCS (Cooney, 2002). Podemos citar uma série de citocinas que dependem deste sistema, como, por exemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, LIF, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF- α , leptina, IFN- γ , IFN- α e IFN- β (Cooney, 2002; Elliot; Johnston, 2004).

É seguro dizer que a sinalização por citocinas através de um número restrito de vias JAK-STAT regula positiva e negativamente todos os tipos celulares envolvidos na iniciação, propagação e resolução da inflamação. Alguns hormônios de extrema importância biológica também desempenham seus papéis através da sinalização por módulos JAK-STAT, entre eles GH. É crucial ressaltar que, canonicamente, as proteínas SOCS-1 e SOCS-3 são as principais reguladoras do ramo da resposta imunológica controlada via JAK-STAT (O'Shea; Murray, 2008).

SOCS-1 tem sido considerado o membro arquetípico da família SOCS e é conhecido como o inibidor mais potente da sinalização por citocinas. Animais *socs1*^{-/-} apresentam um fenótipo gravíssimo; apesar de aparentarem normalidade ao nascer, perecem dentro de três semanas, desenvolvendo esteatose hepática, linfopenia grave, intenso infiltrado de macrófagos em todos os órgãos principais e ativação de células T periféricas. Essa patologia foi associada principalmente como consequência de uma sinalização incontida por IFN- γ , causada por ativação constitutiva de STAT1 (Naka *et al.*, 1998; Starr *et al.*, 1998).

SOCS-3, apesar de ser estruturalmente similar a SOCS-1, difere no mecanismo de regulação negativa da sinalização por citocinas. Enquanto SOCS-1 se liga diretamente às cinases JAK, inibindo sua atividade, SOCS-3 inibe a sinalização através de sua ligação a sítios fosforilados nos receptores, impedindo assim a continuação da atividade das JAKs (Elliot; Johnston, 2004). SOCS-3 está relacionada

ao controle de sinalização via gp130, sendo assim um importante inibidor de citocinas como IL-23 e IL-6 (Stross *et al.*, 2006). SOCS-3 também está implicada no controle da sinalização por G-CSF, na diferenciação e controle de linfócitos Th2, e na diferenciação e atividade de células Th17 (Elliot; Johnston, 2004; O'Shea; Murray, 2008).

No entanto, o papel mais importante de SOCS-1, e em segundo lugar de SOCS-3 para o presente trabalho, é a sua importância como inibidores da sinalização desencadeada por Interferons do Tipo I. IFNs do tipo I são citocinas pleiotrópicas que regulam uma vasta gama de funções celulares, e sua sinalização ocorre fundamentalmente através das vias JAK-STAT (Stetson; Medzhitov, 2006). Arquétipos da resposta antiviral, IFNs do tipo I foram originalmente descritos há mais de 50 anos. Sua sinalização ativa a expressão induzida de centenas de genes que, juntos, estabelecem o conhecido 'estado antiviral', um termo genérico que ilustra bem o conhecimento rudimentar e a compreensão elementar do que realmente ele é. Conhecemos, porém, a função de algumas das famílias de genes induzidos por IFNs do tipo I que possuem amplos e importantes efeitos antivirais, como as 2'-5' oligoadenilato sintetases, a RNase L, a PKR e as proteínas Mx (Van Boxel-Dezaire *et al.*, 2006).

Durante milhões de anos de co-evolução, enquanto os metazoários superiores desenvolvem sistemas extremamente complexos e multifacetados de resposta antiviral, como os Interferons e suas ações, os vírus igualmente desenvolvem sistemas intrincados de evasão e subversão dos mesmos. Os DENV não são exceção. As proteínas NS2A, NS4A e NS4B são capazes de causar a regulação negativa de genes induzidos por IFN- β (Muñoz-Jordán *et al.*, 2003). A NS5 foi demonstrada como capaz de se ligar a STAT2 e torná-la alvo para degradação por mecanismos ainda não identificados (Ashour *et al.*, 2009; Mazzon *et al.*, 2009). E a protease NS2B-3 é capaz de limitar a produção de IFN (Rodriguez-Madoz *et al.*, 2010).

Já que mencionamos subversão e evasão da resposta antiviral, e implicamos o DENV como um hábil fugitivo do sistema de IFN tipo I, é muito relevante levantar a questão das proteínas SOCS sendo alvos do hospedeiro que podem ser exploradas para benefício de vírus. Membros da família SOCS são induzidos durante a infecção por diversos vírus, incluindo o HIV-1, o vírus da hepatite C (HCV), o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da herpes simplex do tipo 1 (HSV-1), o vírus respiratório sincicial

(RSV), o vírus Ebola, o Influenza A, o coxsackie vírus e outros mais, contribuindo para a replicação viral e para a patogênese (Akhtar; Benveniste, 2010). Animais *socs1*^{-/-} são extremamente resistentes à infecção pelo vírus da floresta de Semliki (Fenner *et al.*, 2006). Bode e colaboradores, em 2003, demonstraram que o HCV é capaz de induzir, através de sua proteína estrutural C (core), que forma seu nucleocapsídeo, a expressão de SOCS-3 em células HepG2, o que foi correlacionado com uma inibição da ativação de STAT1 induzida por IFN- α . O HIV-1 também é capaz de induzir a expressão de SOCS-3 através da atividade de sua proteína acessória Tat, atenuando assim a resposta mediada por IFN- β , tanto ao nível da ativação de STAT1 e STAT2 quanto ao nível da expressão de genes antivirais, como PKR e ISG20 (Akhtar *et al.*, 2010).

Apesar de SOCS-2 ter recebido muita atenção como reguladora do metabolismo e do crescimento, sua participação na resposta imune foi, obviamente, subestimada, como demonstrado por diversos trabalhos. Entre esses trabalhos, podemos destacar o de Tannahill e colaboradores em 2005, que demonstrou que SOCS-2 é capaz de regular a atividade de SOCS-1 e SOCS-3, associando-se a elas através da interação de seus domínios SOCS box e marcando-as para degradação no proteassoma através de poliubiquitinação. Outro trabalho relevante é o de Machado e colaboradores em 2006, mostrando a participação fundamental de SOCS-2 como mediador da sinalização desencadeada pela LXA4 durante a resposta frente a uma infecção.

Com base neste conhecimento e na análise dos dados apresentados neste trabalho, podemos formular uma hipótese central: SOCS-2 desempenharia um papel crucial tanto na regulação da resposta, atuando como mediador na sinalização desencadeada pela LXA4, quanto na modulação da atividade de SOCS-1 e SOCS-3. Durante a infecção pelo DENV, observa-se a indução de SOCS-1 e SOCS-3, essenciais para a regulação negativa da atividade dos IFNs do tipo I. O DENV apresenta diversos mecanismos de inibição da resposta de IFN tipo I, sendo que, em sua maioria, apenas os efetores foram identificados, enquanto o mecanismo permanece obscuro. Como evidenciado, na ausência de SOCS-2, observa-se uma expressão surpreendentemente elevada de SOCS-1 e SOCS-3 (Figura 20), agravamento em todos os parâmetros da doença (Figuras 15 a 19) e um aumento exponencial na replicação viral (Figura 21). Dessa forma, sugerimos que SOCS-2, possivelmente através da regulação de SOCS-1 e SOCS-3 por poliubiquitinação

dessas proteínas para subsequente degradação proteassômica, desempenha um papel regulador na infecção pelo DENV neste modelo experimental em camundongos, atuando na manutenção da resposta de IFN tipo I e possivelmente desempenhando um papel na contenção do dano tecidual e sistêmico por meio da atividade de LXA4. Na ausência de SOCS-2, ocorre uma expressão extrema de SOCS-1 e SOCS-3, resultando na inibição das vias de sinalização de IFN tipo I (e provavelmente tipo II), levando a uma proliferação viral descontrolada, que seria a causa dos parâmetros imunopatológicos agravados. Além disso, na ausência de SOCS-2, a LXA4 não é capaz de desempenhar seu papel regulatório na contenção da resposta inflamatória.

Evidentemente, há muito a ser elucidado nesse processo. Não sabemos se a expressão de SOCS-1 e SOCS-3 é induzida diretamente pelo DENV, o que é uma hipótese viável. Desconhecemos a expressão das diversas formas de STAT e quais predominam nos tecidos-alvo durante a infecção pelo DENV. SOCS-2 poderia ter um papel dual, também sendo usada como mecanismo de evasão caso sua expressão fosse inibida. Ainda há muito a ser esclarecido na resposta de IFN tipo I e na regulação desempenhada pelas proteínas SOCS frente à infecção pelo DENV. O presente trabalho mostra que as proteínas SOCS podem desempenhar um papel importante na interação do DENV com seu hospedeiro vertebrado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **J. Gen. Virol.**, [S. l.], v. 89, p. 474–484, 2008.
- AKHTAR, L. N. *et al.* Suppressor of Cytokine Signaling 3 inhibits antiviral IFN- β signaling to enhance HIV-1 replication in macrophages. **J. Immunol.**, [S. l.], v. 185, p. 2393-2404, 2010.
- ALVAREZ, D. E. *et al.* Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. **Virology**, [S. l.], v. 339, p. 200–212, 2005.
- ALEXANDER, W. S. *et al.* SOCS1 is a critical inhibitor of interferon γ signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. **Cell**, [S. l.], v. 98, p. 597–608, 1999.
- ASHOUR, J. *et al.* NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **J. Virol.**, [S. l.], v. 83, p. 5408–5418, 2009.
- ATRASHCHANSKAYA, A. *et al.* Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 33-42, 2003.
- BALMASEDA, A. *et al.* Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. **Am J Trop Hyg**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 449-456, 2006.
- BRESSANELLI, S. *et al.* Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH induced membrane fusion conformation. **EMBO J.**, [S. l.], v. 23, p. 728–738, 2004.
- BABON, J. *et al.* The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. **Mol Cell**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 205–216, 2006.
- BODE, J. G. *et al.* IFN- α antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. **FASEB J.**, [S. l.], v. 17, p. 488-490, 2003.
- BODE, J. G.; BRENNENDORFER, E. D.; HAUSSINGER, D. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. **Arch. Biochem. Biophys.**, [S. l.], v. 462, p. 254-265, 2007.
- CABRERA-HERNANDEZ, A. *et al.* Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. **J. Med. Virol.**, [S. l.], v. 79, p. 386–392, 2007.
- CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol.**, [S. l.], v. 44, p. 649-688, 1990.
- CHANG, D. M.; SHAO, M. F. Production of interleukin-1 (IL-1) and IL-1 inhibitor by

human monocytes exposed to dengue virus. **J. Infect. Dis.**, [S. I.], v. 170, p. 811–817, 1994.

CHAVEZ-SALINAS, S. *et al.* Heat shock effect upon dengue virus replication into U937 cells. **Virus Res.**, [S. I.], v. 138, p. 111–118, 2008.

CHATURVEDI, U. C. *et al.* Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, [S. I.], v. 28, n. 3, p. 183–188, 2000.

CHATUVERDI, U. C. Tumour necrosis factor & dengue. **Indian. J. Med. Res.**, [S. I.], v. 123, p. 11–14, 2006.

CHEN, L. C. *et al.* Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, [S. I.], v. 74, p. 142–147, 2006.

CHEN, Y. *et al.* Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nat. Med.**, [S. I.], v. 3, p. 866–871, 1997.

CHEN, W. *et al.* Vimentin is required for dengue virus serotype 2 infection but microtubules are not necessary for this process. **Arch. Virol.**, [S. I.], v. 153, p. 1777–1781, 2008.

CHIN, J. F.; CHU, J. J.; NG, M. L. The envelope glycoprotein domain III of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry. **Microbes Infect.**, [S. I.], v. 9, p. 1–6, 2007.

CHU, J. J.; YANG, P. L. c-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [S. I.], v. 104, p. 3520–3525, 2007.

CHU, J. J.; LEONG, P. W.; NG, M. L. Analysis of the endocytic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells. **Virology**, [S. I.], v. 349, p. 463–475, 2006.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol.**, [S. I.], v. 80, n. 23, p. 11418–11431, 2006.

COLGAN, S. P. *et al.* Lipoxin A4 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers. **J Clin Invest**, [S. I.], v. 92, n. 1, p. 75–82, 1993.

DEEM, M. W.; HEJAZI, P. Theoretical Aspects of Immunity. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, [S. I.], v. 1, p. 247–276, 2010.

DEJNIRATTISAI, W. *et al.* A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. **J Immunol.**, [S. I.], v. 181, n. 9, p. 5865–5874, 2008.

DIMITROV, D. S. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. **Nat Rev Microbiol.**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 109-122, 2004.

FALCONAR, A. K. 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.**, [S. l.], v. 142, p. 897–916, 1997.

FALGOUT, B. *et al.* Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **J. Virol.**, [S. l.], v. 65, p. 2467–2475, 1991.

FENNER, J. E. *et al.* Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. **Nat. Immunol.**, [S. l.], v. 7, p. 33-39, 2006.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**, [S. l.], v. 371, n. 9611, p. 500-509, 2008.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Curr Opin Infect Dis**, [S. l.], v.19, n. 5, p. 429-436, 2006.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev.**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: The emergence of a global health problem. **Emerg. Infect. Dis.**, [S. l.], v. 1, p. 55–57, 1995.

GUBLERS, D.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. *In*: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (ed.). **Fields Virology**. 5. ed. [S. l.]: Lippicott Williams & Wilkins, 2007.

GERMI, R. *et al.* Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology**, [S. l.], v. 292, p. 162–168, 2002.

GIORDANETTO, F.; KROEMER, R. T. A three-dimensional model of suppressor of cytokine signalling 1 (SOCS-1). **Protein Eng**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 115–124, 2003.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, [S. l.], v. 19, p. 429–436, 2006.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, [S. l.], v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

HALSTEAD, S. B. The Alexander D. Langmuir Lecture. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious disease. **Am. J. Epidemiol.**, [S. l.], v. 114, p. 632–648, 1981.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science**, [S. l.], v. 239, p. 476–481, 1988.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Antibody-enhanced dengue virus infection in

primate leukocytes. **Nature**, [S. I.], v. 265, p. 739–741, 1977.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J.; ALLISON, A. C. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. **J. Exp. Med.**, [S. I.], v. 146, p. 218–229, 1977.

HAHN, C. S. *et al.* Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. **J. Mol. Biol.**, [S. I.], v. 198, p. 33–41, 1987.

HARRIS, E. *et al.* Molecular biology of flaviviruses. **Novartis Found. Symp.**, [S. I.], v. 277, p. 23–39, 2006.

HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Adv. Virus Res.**, [S. I.], v. 59, p. 63–97, 2003.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K.; ALLISON, S. L. The entry machinery of flaviviruses. **Arch. Virol. Suppl.**, [S. I.], 18:133–137, 2004.

HAYES, E. B.; GLUBER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Journal of Pediatric Infectious Diseases**, [S. I.], v. 11, n. 4, p. 311–317, 1992.

HISCOX, J. A. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. **Nat Rev Microbiol**, [S. I.], v. 5, n. 2, p. 119–127, 2007.

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

HUERTA, V. *et al.* Characterization of the interaction of domain III of the envelope protein of dengue virus with putative receptors from CHO cells. **Virus Res.**, [S. I.], v. 137, p. 225–234, 2008.

ISAACS, A.; LIDERMANN, J. Virus interference. I The interferon. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, [S. I.], v. 147, p. 258–267, 1957.

KAWAGUCHI, I.; SASAKI, A.; BOOTS, M. Why are dengue virus serotypes so distantly related? Enhancement and limiting serotype similarity between dengue virus strains. **Proc Biol Sci.**, [S. I.], v. 270, n. 1530, p. 2241–2247, 2003.

KHROMYKH, A. A.; SEDLAK, P. L.; WESTAWAY, E. G. trans-Complementation analysis of the flavivirus Kunjin ns5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. **J. Virol.**, [S. I.], v. 73, p. 9247–9255, 1999.

KHROMYKH, A. A. *et al.* Essential role of cyclization sequences in Flavivirus RNA replication. **J. Virol.**, [S. I.], v. 75, p. 6719–6728, 2001.

KRISHNAN, M. N. *et al.* Rab 5 is required for the cellular entry of Dengue and West Nile viruses. **J. Virol.**, [S. I.], v. 81, p. 4881–4885, 2007.

KURANE, I.; ROTMAN, A. L.; LIVINGSTON, P. G. Immunopathologic mechanisms

of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. **Arch. Virol. Suppl.**, [S. I.], v. 9, p. 59-64, 1994.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, [S. I.], v. 30, n. 5-6, p. 329-340, 2007.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global Spread and Persistence of Dengue. **Annu Rev Microbiol.**, [S. I.], v. 62, p. 71-92, 2008.

LEE, C. J. *et al.* Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. **J. Virol.**, [S. I.], v. 82, p. 6470–6480, 2008a.

LEE, Y. R. *et al.* Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. **Virology**, [S. I.], v. 374, p. 240–248, 2008b.

LEE, E. *et al.* Both E protein glycans adversely affect dengue virus infectivity but are beneficial for virion release. **J. Virol.**, [S. I.], v. 84, p. 5171–5180, 2010.

LEI, H. Y. *et al.* Immunopathogenesis of dengue virus infection. **J Biomed Sci**, [S. I.], v. 8, n. 5, p. 377-388, 2001.

LIGON, B. L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment, and prevention. **Semin Pediatr Infect Dis.**, [S. I.], v. 16, n. 1, p. 60-65, 2005.

LIN, C. F. *et al.* Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. **J. Immunol.**, [S. I.], v. 174, p. 395-403, 2005.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv. Virus Res.**, [S. I.], v. 59, p. 23–61, 2003.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviruses: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (ed.). **Fields' Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2007. p. 1101–1152.

LIN C. F. *et al.* Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. **Viral. Immunol.**, [S. I.], v. 19, p. 127-132, 2006.

LOZACH, P. Y. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **J. Biol. Chem.**, [S. I.], v. 280, p. 23698-23708, 2005.

MARKOFF, L.; FALGOUT, B.; CHANG, A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. **Virology**, [S. I.], v. 233, p. 105–117, 1997.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the

spread and resurgence of japanese encephalitis, west Nile and dengue viruses. **Nat Med.**, [S. I.], v. 10, suppl. 12, p. 98-109, 2004.

MAGNER, L. N. **A History of Infectious Diseases and the Microbial World** (Healing Society: Disease, Medicine, and History). London: Praeger, 2009.

MAIRUHU, A.T. *et al.* Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, [S. I.], v. 23, n. 6, p. 425-433, 2004.

MANSELL, A. *et al.* Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. **Nature Immunol.**, [S. I.], v. 7, p. 148–155, 2006.

METCALF, D. *et al.* Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1). **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, [S. I.], v. 99, p. 943–948, 2002.

MILLER, J. L. *et al.* The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog.**, [S. I.], v. 4, n. 2, p. e17, 2008.

MILLER, S.; KRIJNSE-LOCKER, J. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. **Nat. Rev. Microbiol.**, [S. I.], v. 6, p. 363–374, 2008.

MILLER, S.; SPARACIO, S.; BARTENSCHLAGER, R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 non-structural protein 4B. **J. Biol. Chem.**, [S. I.], v. 281, p. 8854–8863, 2006.

MILLER, S. *et al.* The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2 K- regulated manner. **J. Biol. Chem.**, [S. I.], v. 282, p. 8873–8882, 2007.

MONATH, T. P. Dengue: The risk to developed and developing countries. **PNAS**, [S. I.], v. 91, p. 2395-2400, 1994.

MONGKOLSAPAYA, J. *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, [S. I.], v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. **Nature**, [S. I.], v. 430, p. 242–249, 2004.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat. Rev. Microbiol.**, [S. I.], v. 3, p. 13–22, 2005.

MUNOZ-JORDAN, J. L. *et al.* Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, p. 14333–14338, 2003.

MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nat Rev Microbiol.**, [S. I.], p. 7-16, 2008.

NAKA, T. *et al.* Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, [S. I.], v. 95, p. 15577–15582, 1998.

NAVARRO-SANCHEZ, E.; DESPRES, P.; CEDILLO-BARRON, L. Innate immune responses to dengue virus. **Arch Med Res**, [S. I.], v. 36, n. 5, p. 425-435, 2005.

NISALAK, A. *et al.* Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok Thailand from 1973 to 1999. **Am J Trop Hyg.**, [S. I.], v. 68, n. 2, p. 191-202, 2003.

NICHOLSON, S. E. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2- binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, [S. I.], v. 97, n. 12, p. 6493–6498, 2000.

NOGUEIRA, R. M. *et al.* Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis**, [S. I.], v. 11, n. 9, p. 1376-1381, 2005.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, [S. I.], v. 28, n. 4, p. 477–487, 2008.

PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunol Cell Biol.**, [S. I.], v. 85, n. 1, p. 43-45, 2007.

PERSICO, M. *et al.* Elevated expression and polymorphisms of SOCS3 influence patient response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. **Gut**, [S. I.], v. 57, p. 507-515, 2008.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection. **Expert Rev Mol Med.**, [S. I.], v. 10, p. 1-14, 2008.

PIESSEVAUX, J. *et al.* 2008. The many faces of the SOCS box. **Cytokine Growth Factor Rev.**, [S. I.], v. 19, p. 371-381, 2008.

PIESSEVAUX J. *et al.* Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. **J Biol Chem.**, [S. I.], v. 281, n. 44, p. 32953–32966, 2006.

PORTER, K.; MOHAPATRA, S. S. Attenuation of dengue virus infection by adenoassociated virus-mediated siRNA delivery. **Genet. Vaccines Ther.**, [S. I.], v. 2, p. 8, 2004.

POLACEK, C.; FOLEY, J. E.; HARRIS, E. Conformational changes in the solution structure of the dengue virus 5' end in the presence and absence of the 3' untranslated region. **J. Virol.**, [S. I.], v. 83, p. 1161–1166, 2009.

POLACEK, C.; FRIEBE, P.; HARRIS, E. Poly(A)-binding protein binds to the nonpolyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation

efficiency. **J. Gen. Virol.**, [S. I.], v. 90, p. 687–692, 2009.

RAM, P. A.; WAXMAN, D. J. SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. **J Biol Chem**, [S. I.], v. 274, n. 50, p. 35553–35561, 1999.

REYES-DEL VALLE, J. *et al.* Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. **J. Virol.**, [S. I.], v. 79, p. 4557–4567, 2005.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **J Clin Invest.**, [S. I.], v. 113, n. 7, p. 946-951, 2004.

SAMSA, M. M. *et al.* Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. **PLoS Pathog.**, [S. I.], v. 5, p. e1000632, 2009.

SCHRODER, K. *et al.* Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.**, [S. I.], v. 75, p. 163-189, 2004.

SEN, G. C. Viruses and interferons. **Annu Rev Microbiol.**, [S. I.], v. 55, p. 255-281, 2001.

SERHAN, C. N. *et al.* Novel functional sets of lipid- derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. **J Exp Med**, [S. I.], v. 192, n. 8, p. 1197-1204, 2000.

SERHAN, C. N. Systems approach to inflammation resolution: identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. **J Thromb Haemost**, [S. I.], v. 7, suppl. 1, p. 44-48, 2009.

SHRESTA, S. *et al.* Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. **Virology**, [S. I.], v. 319, n. 2, p. 262-273, 2004a.

SHRESTA, S. *et al.* Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **J Virol.**, [S. I.], v. 78, n. 6, p. 2701-2710, 2004b.

SHRESTA, S. *et al.* Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. **J. Virol.**, [S. I.], v. 80, p. 10208-10217, 2006.

SOUZA, D. *et al.* Effects of PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of superior mesenteric artery in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, [S. I.], v. 131, p. 1800-1808, 2000a.

SOUZA, D. *et al.* Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, [S. I.], v. 403, p. 21-28, 2000b.

STARR, R. *et al.* Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, [S. I.], v. 95, p. 14395–14399, 1998.

STETSON, D. B.; MEDZHITOV, R. Type I interferons in host defense. **Immunity**, [S. I.], v. 25, n. 3, p. 373-381, 2006.

TAN, G. K.; ALONSO, S. Pathogenesis and prevention of dengue virus infection: state-of-the-art. **Curr Opin Infect Dis**, [S. I.], v. 22, n. 3, p. 302-308, 2009.

TANNAHILL, G. M. *et al.* SOCS2 can enhance interleukin-2 (IL-2) and IL-3 signaling by accelerating SOCS3 degradation. **Mol Cell Biol**, [S. I.], v. 25, n. 20, p. 9115–9126, 2005.

TASSANEETRITHEP, B. *et al.* DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, [S. I.], v. 197, p. 823-829, 2003.

THEOFILOPOULOS, A. N. Replication of dengue-2 virus in cultured human lymphoblastoid cells and subpopulations of human peripheral leukocytes. **J Immunol.**, [S. I.], v. 117, p. 953-961, 1976.

VAN BOXEL-DEZAIRE, A. H.; RANI, M. R.; STARK, G. R. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. **Immunity**, [S. I.], v. 25, p. 361–372, 2006.

VAN DER SCHAAR, H. *et al.* Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. **PLoS Pathog**, [S. I.], v. 4, n. e1000244, p. 1–9, 2008.

WANG, S. H. *et al.* Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. **J. Gen. Virol.**, [S. I.], v. 83, p. 3093–3102, 2002.

WHITEHEAD, S. S. *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol.**, [S. I.], v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue**: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO press, 2009.

YASUKAWA, H. *et al.* The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. **EMBO J**, [S. I.], v. 18, n. 5, p. 1309–1320, 1999.

YAO, Z. Q. *et al.* Differential regulation of SOCS-1 signalling in B and T lymphocytes by hepatitis C virus core protein. **Immunology**, [S. I.], v. 125, p. 197-207, 2008.

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

YU, I. M. *et al.* Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, [S. I.], v. 319, n. 5871, p. 1834-1837, 2008.

YU, L. *et al.* Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. **Virology**, [S. I.], v. 374, p. 170–185, 2008b.

ZHANG, Y. *et al.* Structures of immature flavivirus particles. **EMBO J.**, [S. I.], v. 22, p. 2604–2613, 2003.

ZHANG, W. *et al.* Up-regulated expression of beta3 integrin induced by dengue virus serotype 2 infection associated with virus entry into human dermal microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, , [S. I.], 356:763–768, 2007.

ZYBERT, I. A., VAN DER ENDE-METSELAA, H., WILSCHUT, J., AND SMIT, J. M. (2008). Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J. Gen. Virol.* 89:3047–3051.