

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Microbiologia

Ingredy Beatriz Souza Passos

Papel antiviral do peptídeo AH-D na infecção pelo vírus da dengue

Belo Horizonte
2021

Ingredy Beatriz Souza Passos

Papel antiviral do peptídeo AH-D na infecção pelo vírus da dengue

Versão final

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

Orientadora - Profa. Dra.
Vivian Vasconcelos Costa.

Belo Horizonte
2021

043

Passos, Ingedy Beatriz Souza.

Papel antiviral do peptídeo AHD em modelo de infecção pelo vírus da Dengue [manuscrito] / Ingedy Beatriz Souza Passos. – 2021.
122 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora - Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa.

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

1. Microbiologia. 2. Dengue. 3. Antivirais. I. Costa, Vivian Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE INGREDY BEATRIZ SOUZA PASSOS

Nº REGISTRO: 2020659020

Às 09:00 horas do dia **14 de DEZEMBRO de 2021**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Danielle da Glória de Souza (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e Luciana Jesus da Costa (UFRJ), Profa. Vivian Vasconcelos Costa – Orientadora, para julgar o trabalho final "**Papel antiviral do peptídeo AHD em modelo de infecção pelo vírus da dengue**", da aluna **ingredy Beatriz Souza Passos**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Vivian Vasconcelos Costa - orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo 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. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2021

Membros da banca:

Dra. Danielle da Glória de Souza

Dra. Luciana Jesus da Costa

De acordo:

Profa. Vivian Vasconcelos Costa

(Orientadora)

Prof. Daniel de Assis Santos
(Subcoordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)

*Dedico este trabalho à
-Deus, pela força e coragem para cumprir este
desafio.*

*Minha família por todo apoio que sempre me deram na busca pela realização dos
meus sonhos.*

*Minha orientadora Vivian, pela convivência, apoio, aprendizagem e companheirismo
de sempre.*

*Grupo de Imunofarmacologia pela troca de conhecimento e oportunidade de
crescimento como profissional e como ser humano.*

AGRADECIMENTOS

Há 4 anos, quando ingressava no laboratório não imaginava que iria evoluir tanto. Sempre costumo dizer que o pouquinho do que sei hoje, como profissional, aprendi com o grupo. Não tem melhor definição para o fim deste ciclo senão gratidão.

A Deus, por me permitir concluir essa etapa com pessoas tão especiais ao meu lado e principalmente pela oportunidade. Reconheço que chegar até aqui era algo totalmente improvável de acontecer em minha vida, sem o cuidado de Deus.

À minha família, especialmente minha mãe e minha avó que me deram muito apoio desde a graduação, sempre me motivando a seguir em frente. Agradeço pela coragem que sempre me transmitiram, pelos conselhos e principalmente pelas orações. Vocês são meu porto seguro, meu exemplo de força e garra.

Agradeço muito à minha orientadora, muito mais que orientadora, pelo apoio que sempre me deu. Por ter enxergado em mim um potencial que eu não imaginava que existia, lá atrás em 2017 quando entrei para o grupo. Agradeço por estes 4 anos de parceria, de cumplicidade, de puxões de orelha (às vezes doloridos, mas sempre carinhosos) e principalmente por me mostrar que EU POSSO IR ALÉM. Você me ensinou a acreditar em mim. E eu serei eternamente grata por isso.

Aos colegas integrantes do “Viviridae” pelas horas de trabalho compartilhadas, pelo aprendizado e por muitas vezes tornarem a rotina mais leve.

À Josy, Dani e Matheus, especialmente por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Ilma, Rose, Hermes, Gil e Frank pelo apoio técnico.

A todos os demais integrantes do grupo, especialmente aos professores Dani, Mauro, e Flávio pelo acolhimento e respeito que me dedicaram.

As professoras Luciana e Danielle por aceitarem fazer parte da banca.

À Fapemig, Capes, CNPq, INCT em dengue pelo suporte financeiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)

RESUMO

Em razão da co-circulação e hiper-endemicidade de múltiplos sorotipos do vírus da dengue em vários países, a dengue se tornou a arbovirose de maior incidência e expansão geográfica. Estima-se que metade da população mundial vive em áreas de risco para infecção. A infecção por um dos quatro sorotipos do vírus da dengue provoca um amplo espectro de manifestações clínicas que variam de assintomáticas, brandas e/ou similares a outras infecções virais até manifestações intensas/graves podendo levar o indivíduo a óbito. Trata-se de uma doença sem tratamento específico, responsável por um número elevado de hospitalizações, com crescente taxa de mortalidade e, representando um importante problema de saúde pública. Dessa forma, o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas, bem como o estudo dos mecanismos pelos quais há o estabelecimento da doença e os eventos envolvidos na interação vírus-hospedeiro são pontos indispensáveis para o avanço no manejo da dengue. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antiviral do peptídeo AH-D, com conhecida atividade antiviral contra outros flavivírus relacionados, no curso da infecção pelo vírus da dengue. Para este fim, duas estratégias experimentais foram utilizadas - I) A citotoxicidade das amostras foi inicialmente avaliada em células Vero CCL-81, as quais foram empregadas no ensaio de atividade antiviral na presença ou ausência do peptídeo AH-D. II) Avaliação *in vivo* do potencial antiviral do peptídeo AH-D. Para isso foram utilizados camundongos knockout para o gene que codifica o receptor dos Interferons do Tipo-I α/β (A129) infectados pelo DENV e seus respectivos controles. Em diferentes momentos após a infecção os animais foram submetidos ao tratamento com o peptídeo antiviral por via intravenosa. Posteriormente foram analisados diversos parâmetros a saber i) carga viral em diversos tecidos; ii) parâmetros clínicos e inflamatórios; iii) e, curva de sobrevivência a fim de avaliar a eficácia do peptídeo neste modelo. Nossos resultados demonstram que o tratamento com o peptídeo AH-D em células Vero CCL-81 resultou em redução da carga viral de maneira dose-dependente e redução da morte celular. *In vivo* a administração intravenosa do peptídeo não resultou em redução das cargas virais, como observado *in vitro*, no entanto houve melhora nos parâmetros clínicos como a prevenção da perda de massa corporal e trombocitopenia, além da letalidade nestes animais. No geral, o tratamento com AH-D foi capaz de prevenir as principais manifestações induzidas pela infecção por DENV.

Palavras-chave - Dengue, antiviral, tratamento, infecção.

ABSTRACT

Due to the co-circulation and hyper-endemicity of multiple dengue virus serotypes in several countries, dengue has become the arbovirus with the highest incidence and geographic expansion. It is estimated that half of the world's population lives in areas at risk for infection. Infection with one of the four dengue virus serotypes causes a wide spectrum of clinical manifestations that range from asymptomatic, mild and/or similar to other viral infections to intense/severe manifestations that can lead to death. It is a disease without specific treatment, responsible for a high number of hospitalizations, with an increasing mortality rate and representing an important public health problem. Thus, the development of prophylactic and therapeutic measures, as well as the study of the mechanisms by which the disease is established and the events involved in the virus-host interaction are essential points for advancing in the management of dengue. In this context, the aim of the present work was to evaluate the antiviral activity of the AH-D peptide, with known antiviral activity against other related flaviviruses, in the course of dengue virus infection. For this purpose, two experimental strategies were used - I) The cytotoxicity of the samples was initially evaluated in Vero CCL-81 cells, which were used in the assay of antiviral activity in the presence or absence of the AH-D peptide. II) *In vivo* evaluation of the antiviral potential of the AH-D peptide. For this purpose, knockout mice for the gene encoding the α/β Interferon Type-I receptor (A129) infected by DENV and their respective controls were used. At different times after infection, the animals were treated with the antiviral peptide intravenously. Afterwards, several parameters were analyzed, namely i) viral load in different tissues; ii) clinical and inflammatory parameters; iii) and, survival curve in order to evaluate the effectiveness of the peptide in this model. Our results demonstrate that treatment with the AH-D peptide in Vero CCL-81 cells resulted in a dose-dependent reduction in viral load and a reduction in cell death. *In vivo*, the intravenous administration of the peptide did not result in a reduction in viral loads, as observed *in vitro*, however there was an improvement in clinical parameters such as the prevention of loss of body mass and thrombocytopenia, in addition to the lethality in these animals. Overall, treatment with AH-D was able to prevent the main manifestations induced by DENV infection.

Keywords - Dengue, antiviral, treatment, infection.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Distribuição geográfica dos casos de dengue no mundo até 2017	18
Figura 2 - Número de casos e óbitos de Dengue, Chikungunya, Zika, no Brasil, de 2008 a 2019	19
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura conformacional e genética do Dengue virus.	21
Figura 4 - Estrutura da partícula viral imatura e madura.....	22
Figura 5 - Ciclo urbano do vírus da dengue em humanos e mosquitos.	23
Figura 6 - Representação esquemática dos vários órgãos e suas respectivas células infectados pelo DENV	25
Figura 7- Ciclo de multiplicação do vírus da dengue no hospedeiro humano	26
Figura 8 - Resposta imune inata contra a infecção pelo DENV	28
Figura 9 - Resposta de IFN tipo I e ativação do complemento na infecção por DENV.	29
Figura 10 - Resposta imunológica na infecção primária e secundária	33
Figura 11- Pecado antigênico original.....	35
Figura 12 - Patogênese da infecção pelo DENV.....	36
Figura 13 - Classificação clínica da dengue.....	38
Figura 14 - Sintomas da dengue	40
Figura 15 - Esquema das principais categorias de candidatos a biomarcadores para predições acerca da progressão da dengue.....	41
Figura 16 - Opções de diagnóstico laboratorial em um paciente com suspeita de infecção por dengue	42
Figura 17 - Comparação dos testes diagnósticos de acordo com sua acessibilidade e confiabilidade	44
Figura 18 - Ciclo de multiplicação do DENV e etapas inibidas por medicamentos reposicionados	48
Figura 19 - Ilustração esquemática do modelo de formação de poros induzida pelo peptídeo AH-D.	51
Figura 20 - Fluxograma de trabalho para o desenvolvimento do projeto	57
Figura 21- Estratégia experimental aplicada a caracterização do efeito anti-DENV do peptídeo AH-D in vitro	65
Figura 22 - Desenho de placa utilizado na caracterização do efeito anti-DENV do peptídeo AH-D in vitro	66
Figura 23 - Estratégia experimental para definição do inóculo viral no modelo	66
Figura 24 - Estratégia experimental para caracterização do modelo de infecção com o inóculo escolhido na estratégia I.....	67
Figura 25 - Estratégia experimental para análise da permeabilidade vascular no modelo proposto	68
Figura 26 - Estratégia experimental para escolha da dose de administração do peptídeo	68
Figura 27 - Estratégia experimental para avaliação do potencial antiviral e terapêuticodo tratamento com o peptídeo AH-D na infecção pelo DENV-3 <i>in vivo</i>	69

Figura 28 - Efeito do tratamento com o peptídeo AH-D em células infectadas pelo DENV-3.....	71
Figura 29 - Efeito do tratamento com o peptídeo AH-D em células infectadas pelo vírus da febre amarela	72
Figura 30 - Efeito do tratamento com o peptídeo AH-D em células infectadas ou não com o ZIKV	73
Figura 31 - Efeito do tratamento com o peptídeo AH-D em células infectadas ou não com o CHIKV	73
Figura 32 - A infecção de camundongos A129 pelo DENV-3 leva a morbimortalidade em todos os inóculos administrados.....	75
Figura 33 - A infecção pelo DENV-3 em camundongos A129 induz perda de massa corporal, plaquetopenia, lesão hepática e leucocitose	75
Figura 34 - Animais infectados pelo DENV apresentaram recrutamento de neutrófilos para os tecidos e viremia.....	78
Figura 35 - A infecção pelo DENV induziu o aumento de citocinas/quimiocinas no plasma e baço	79
Figura 36 - Animais infectados pelo DENV apresentaram infiltrado celular no tecido hepático.....	80
Figura 37 - A infecção pelo DENV induziu extravasamento plasmático em animais A129.....	81
Figura 38 - Animais infectados pelo DENV submetidos ao tratamento com AH-D apresentaram redução da perda de massa corporal e do percentual de letalidade.....	82
Figura 39 - O tratamento com o peptídeo AH-D não provocou alterações teciduais em animais não-infectados submetidos ao tratamento	83
Figura 40 - O tratamento com o peptídeo AH-D reduziu a carga viral no cérebro de camundongos infectados pelo DENV-3.....	84
Figura 41 - Animais infectados e tratados não apresentaram plaquetopenia	85
Figura 42 - Animais tratados apresentaram aumento do recrutamento de neutrófilos para o fígado e de verde indocianina no plasma.....	86
Figura 43 - O tratamento com o peptídeo AH-D induziu alterações no perfil de citocinas/quimiocinas em animais infectados pelo DENV-3.....	87
Figura 44 - Animais infectados submetidos ao tratamento apresentaram redução do infiltrado inflamatório quando comparados ao grupo veículo	88
 Tabela 1 - Modelos experimentais murinos usados para estudos pré-clínicos da infecção pelo DENV	 53

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	Intensificação mediada por anticorpos
A129	Animal deficiente para o receptor dos interferons do tipo I (Interferons α e β)
BOD	Demanda biológica de oxigênio
C	Proteína C do capsídeo
CCL	Ligante de quimiocina CC
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CXCL	Ligante de quimiocina CXC
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin</i>
DENV	Vírus da dengue
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
E	Proteína E do envelope
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FHD	Febre hemorrágica do dengue
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de interferon α / β
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IRF	Fator regulador de interferon
JAK	Janus quinase
LEAD	Lipid Envelope Antiviral Disruption
L.SIGN	Integrinas específicas do fígado e linfonodos
M	Proteína M da membrana
MAVS	Proteína de sinalização antiviral mitocondrial
MPO	Mieloperoxidase
NS1-5	Proteínas não-estruturais 1 a 5
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	<i>O-phenyldiamine dihydrochloride</i>
PBS	Tampão fosfato.salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PFU	Unidade formadora de placas

PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RE	Reticulo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
SCD	Síndrome do choque da dengue
SE	Semana epidemiológica
SFB	Soro fetal bovino
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TAM	Receptores Axl, Mer e Tyro
TIM	Receptores de fosfatidilcerina das células T com domínio imunoglobulina e mucina
TLRs	Receptores do tipo Toll
TRAF	Fator associado ao receptor de TNF
vRNA	RNA viral
ZIKV	<i>Zika virus</i>

SUMÁRIO

I. REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 Histórico da transmissão do Dengue virus no mundo e epidemiologia.....	17
1.2 A partícula viral- Estrutura e organização do genoma	20
1.3 Transmissão, ciclo de multiplicação do DENV e sua interação com o hospedeiro humano.....	22
1.4 Patogênese.....	31
1.5 Manifestações clínicas, diagnóstico, tratamento e prevenção	36
1.6 Antivirais	46
1.7 Peptídeo antiviral AH-D	50
1.8 Modelos experimentais aplicados ao estudo da infecção pelo DENV.....	53
II. JUSTIFICATIVA	55
III. OBJETIVOS	56
3.1 Objetivo geral.....	56
3.2 Objetivos específicos	56
IV. METODOLOGIA	57
4.1 Ensaio de morte celular (LDH).....	57
4.2 Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	58
4.3 Animais/ infecção.....	58
4.4 Vírus	59
4.5 Determinação da carga viral	60
4.6 Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas	61
4.7 Detecção indireta do acúmulo de neutrófilos (mpo) nos tecidos.....	61
4.8 Avaliação da permeabilidade vascular.....	62
4.9 Análise hematológica.....	63
4.10 Análise histopatológica.....	63
4.11 Atividade da função hepática	64
4.12 Teste de função hepática	64
4.13 Esquemas dos protocolos experimentais.....	64
4.11 Análise estatística	69
4.12 Pesquisa bibliográfica	70
V. RESULTADOS	71

I. O peptídeo AH-D apresentou atividade antiviral contra diversos arbovírus <i>in vitro</i>	71
II. A infecção com 2×10^3 PFU do DENV-3 foi capaz de induzir alterações clínicas características da dengue, incluindo plaquetopenia, viremia e extravasamento plasmático em camundongos A129.....	75
III. O tratamento com o peptídeo AH-D foi capaz de reduzir a letalidade de camundongos infectados em todas as doses administradas.....	82
IV. O tratamento com o peptídeo AH-D não foi capaz de reduzir a carga viral sistêmica, mas reduziu a carga viral no cérebro de animais A129 infectados pelo DENV-3.....	84
V. Animais infectados submetidos ao tratamento não apresentaram plaquetopenia induzida pelo DENV.....	85
VI. Animais submetidos ao tratamento apresentaram aumento do recrutamento celular para o fígado.....	86
VII. Camundongos infectados submetidos ao tratamento apresentaram alterações no perfil de mediadores inflamatórios.....	87
VIII. O tratamento com o peptídeo AH-D foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório no fígado no 5º dia após a infecção.....	88
VI. DISCUSSÃO	89
VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
VIII. PERSPECTIVAS	93
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXO I	107
ANEXO II	108
ANEXO III	112
ANEXO IV	113
ANEXO V	121

I. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Histórico da transmissão do Dengue virus no mundo e epidemiologia

Não existe um consenso de quando exatamente a dengue surgiu pela primeira vez na população humana. Os primeiros relatos encontrados foram documentados na Enciclopédia Chinesa de Sintomas e Remédios para Doenças, publicadas durante a dinastia Chin (265 a 420 d.C.) (NOBUCHI,1979). Entretanto, casos bem documentados de uma epidemia que se acredita ter sido de dengue ocorreram no período entre 1779 e 1780 na Ásia, África e América do Norte. A doença foi chamada de veneno da água pelos chineses, que entenderam que o quadro, de algum modo, estava correlacionado com insetos e água.

Embora a etiologia viral da doença tenha sido sugerida experimentalmente há mais de um século (GUBLER, 1998), somente após a Segunda Guerra Mundial os avanços tecnológicos permitiram aos cientistas japoneses e americanos o isolamento dos primeiros dois sorotipos do vírus (DENV-1 e DENV-2). Os sorotipos três e quatro foram isolados quando a febre hemorrágica do dengue (FHD) e a síndrome do choque do dengue (SCD) emergiram nos centros urbanos das Filipinas e Tailândia (KYLE; HARRIS, 2008).

Antes de 1970, apenas 9 países haviam experimentado epidemias graves de dengue. A doença agora é endêmica em mais de 100 países, nas regiões da África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental, como demonstrado na Figura 1, sendo que as regiões da América, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental são as mais seriamente afetadas, com a Ásia representando ~ 70% da carga global de doenças (OMS, 2020).

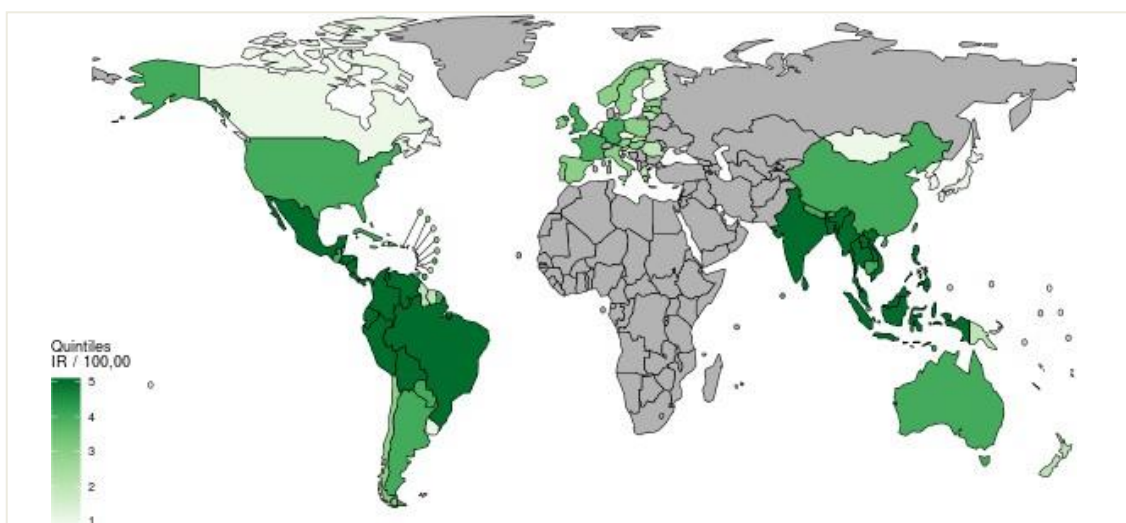


Figura 1- Distribuição geográfica dos casos de dengue no mundo até 2017. A dengue apresenta distribuição por praticamente todos os continentes do globo, sendo mais prevalente nas áreas de clima tropical e subtropical, favoráveis à proliferação do mosquito vetor. No mapa a intensidade de casos registrados é demonstrada através da intensidade da cor verde, ou seja, quanto mais intensa a cor, maior o número de casos registrados naquela área. **Fonte-** OMS, 2020.

Não apenas o número de casos está aumentando conforme a doença se espalha para novas áreas, mas surtos estão ocorrendo a cada ano. Na Europa, transmissão local foi notificada pela primeira vez na França e na Croácia em 2010 e casos importados foram detectados em 3 outros países europeus. Desde então, os casos autóctones são observados quase anualmente em muitos países europeus. Entre os viajantes que retornam de países de renda baixa e média, a dengue é a segunda causa de febre mais diagnosticada depois da malária (OMS, 2020).

No Brasil, acredita-se que o vírus emergiu durante o século XVIII, nos navios negreiros. O sorotipo 1 (DENV-1), predominante na década de 80, foi sucedido pelo sorotipo 2 (DENV-2) já na década de 90. Posteriormente vieram os sorotipos 3 (DENV-3) e 4 (DENV-4), em 2000 e 2007, respectivamente (NOGUEIRA et al., 2007; MOTA et al., 2016).

Atualmente, nota-se um cenário epidemiológico complexo, com a co-circulação dos 4 sorotipos do DENV e circulação simultânea dos vírus Chikungunya (CHIKV) a partir de 2014 e Zika (ZIKV) em 2015. De acordo com o Ministério da Saúde, entre 2008 e 2019, foram notificados aproximadamente 11,6 milhões de casos de dengue, chikungunya e zika no país. Neste mesmo período foram confirmados 7.043 óbitos por essas doenças, sendo que a dengue isoladamente concentrou 91% dos casos

(10,6 milhões) e foi responsável por 91,2% dos óbitos (6.429), afirmando ainda mais o protagonismo dessa arbovirose frente as demais, como demonstrado na Figura 2 a seguir (SVS, 2020).

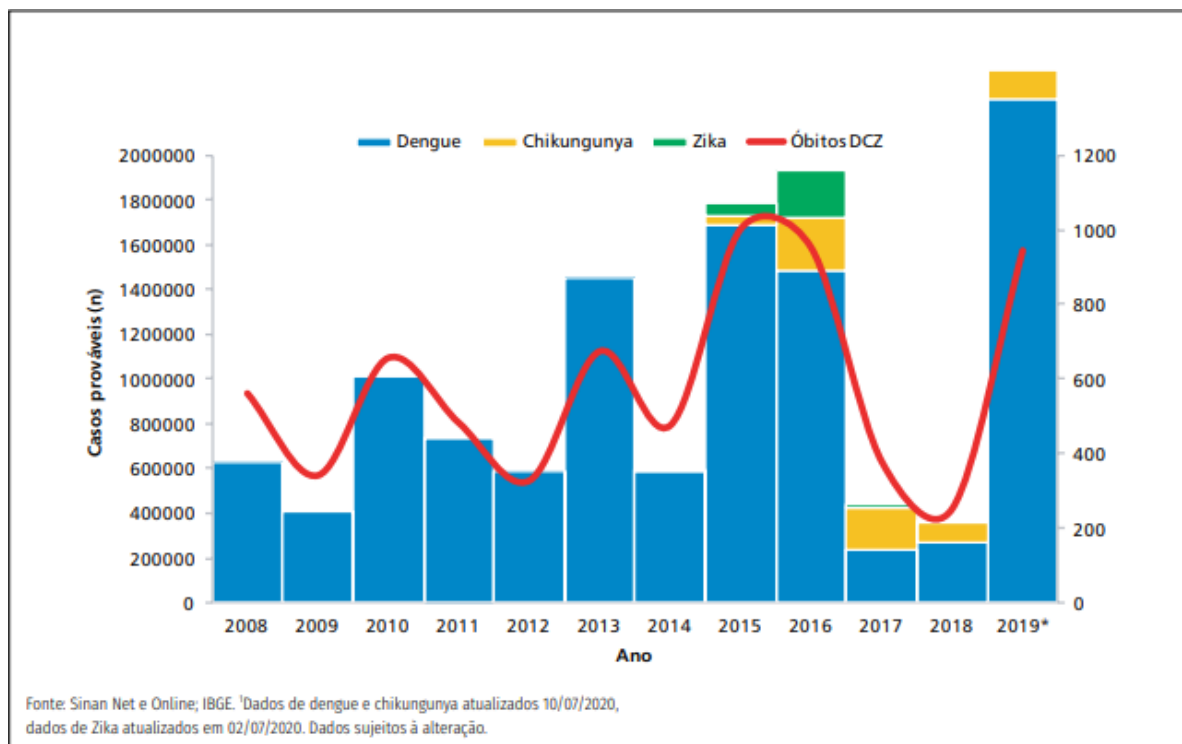


Figura 2- Número de casos e óbitos de Dengue, Chikungunya, Zika, no Brasil, de 2008 a 2019.
Fonte- SVS, 2020.

O boletim epidemiológico mais recente (Semana epidemiológica 1 a 47), que compreende o período entre 03/01/2021 e 27/11/2021, relata a ocorrência de 502.983 casos prováveis de dengue no Brasil. Em comparação com o ano de 2020, houve redução de 46% de casos registrados para o mesmo período analisado (SVS, 2021). Diversos trabalhos publicados recentemente discutem as dificuldades de diagnóstico da dengue durante a pandemia da Covid-19, visto que os sinais e sintomas de ambas as condições são semelhantes (CHEN et al., 2020). Yan e colaboradores (2020) demonstraram a incidência de resultados falso-positivo para dengue em pacientes que foram posteriormente diagnosticados com Covid-19 em Cingapura (YAN et al., 2020). Diante disso, é possível afirmar que o número de casos de dengue durante a pandemia pode ser maior ou menor, levando em consideração os relatos de reatividade cruzada de anticorpos anti-Dengue e anti-SARSCOV-2 nos testes sorológicos (MASYENI et al., 2020).

Em 2019, Messina e colaboradores trouxeram o alerta para a expansão

geográfica da dengue devido aos fenômenos globais, incluindo mudanças climáticas e urbanização. Prevê-se que grande parte do sudeste dos EUA se tornará endêmica até 2050, e que a doença poderá atingir altitudes mais elevadas a exemplo do México (área central), norte da Argentina e interior da Austrália. Muitas das grandes cidades do litoral leste da China e do Japão também devem se tornar endêmicas até 2050.

1.2 A partícula viral- Estrutura e organização do genoma

Os vírus da dengue são arbovírus do gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*. Os quatro sorotipos, antigenicamente distintos, compartilham ~65-70% de homologia em sua sequência de aminoácidos (SIKKA et al., 2016). São partículas virais esféricas e envelopadas, com genoma que compreende aproximadamente 11 kb de sentido positivo e RNA de cadeia simples. O genoma do DENV codifica três proteínas estruturais que são- a proteína da membrana (M), proteína do envelope (E) e proteína do capsídeo (C) e sete não estruturais (NS), como descrito na Figura 3 (CHAMBERS et al., 1990).

A proteína M funciona como uma estrutura que recobre e protege a proteína E de sofrer fusão prematura antes da liberação do vírion. A proteína E está organizada na superfície da partícula viral e facilita a adsorção viral em células hospedeiras ligando-se a receptores celulares e mediando a fusão das membranas viral e celular. Por fim, a proteína C está envolvida na encapsulação do vírion (SCREATON et al., 2015).

As proteínas não estruturais são denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. A proteína NS1 está envolvida no complexo de replicação do RNA viral, bem como na subversão da resposta do hospedeiro através da inibição da ativação do complemento; NS2A está envolvida nas etapas de replicação e posterior empacotamento do RNA, além do antagonismo do Interferon (IFN); NS2B associa-se com NS3 para formar o complexo de protease e atua como um cofator na ativação estrutural da protease serina DENV de NS3; NS3 é uma proteína multifuncional com atividade enzimática de serina protease semelhante a quimotripsina, RNA helicase e RNA trifosfatase (RTP / NTPase) e está envolvida na clivagem da poliproteína DENV, bem como na replicação do RNA; NS4A induz alterações de membrana que são importantes para a replicação do vírus; NS4B auxilia na replicação do RNA viral por meio de sua interação direta com a NS3 e bloqueia a transdução de sinal induzida por

IFN; e NS5 é uma enzima bifuncional com atividade de metiltransferase e RNA polimerase dependente de RNA (HARAPAN et al., 2020).

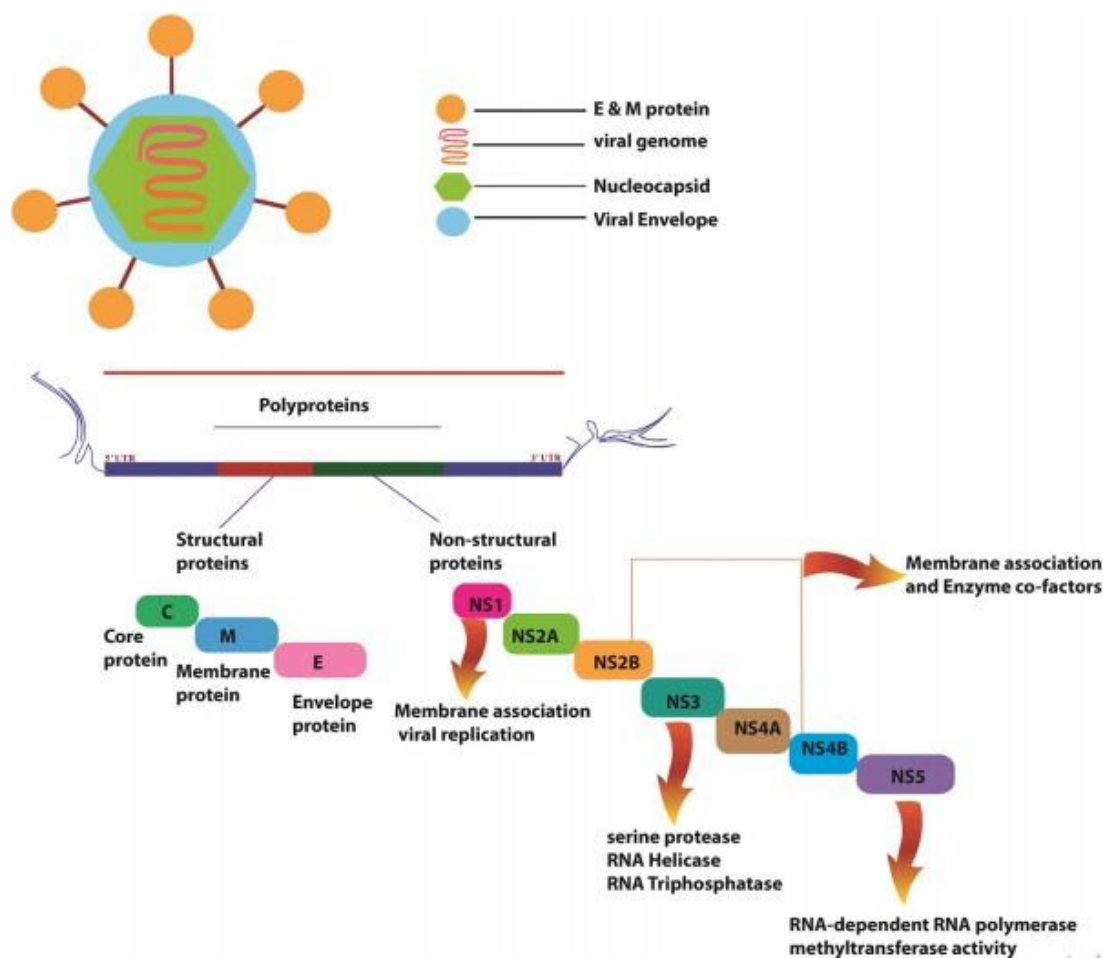


Figura 3- Representação esquemática da estrutura conformacional e genética do Dengue vírus.

Diagrama do genoma do RNA do vírus da dengue que codifica três proteínas estruturais, a saber, proteína do capsídeo (C), proteína associada à membrana (prM, M) e proteína do envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) **Fonte-** Adaptado de Qamar, 2019.

A morfologia da partícula viral pode variar de acordo com a clivagem da proteína precursora de membrana (prM). Isso porque durante a montagem do vírion várias de suas cópias se associam com várias cópias da proteína M, formando partículas imaturas, de aparência irregular com aspecto “espinhoso”. As partículas maduras secretadas pela célula hospedeira possuem aparência regular (SCREATON et al., 2015). Na Figura 4 é possível visualizar as diferentes formas da partícula viral de acordo com seu estágio de maturação.

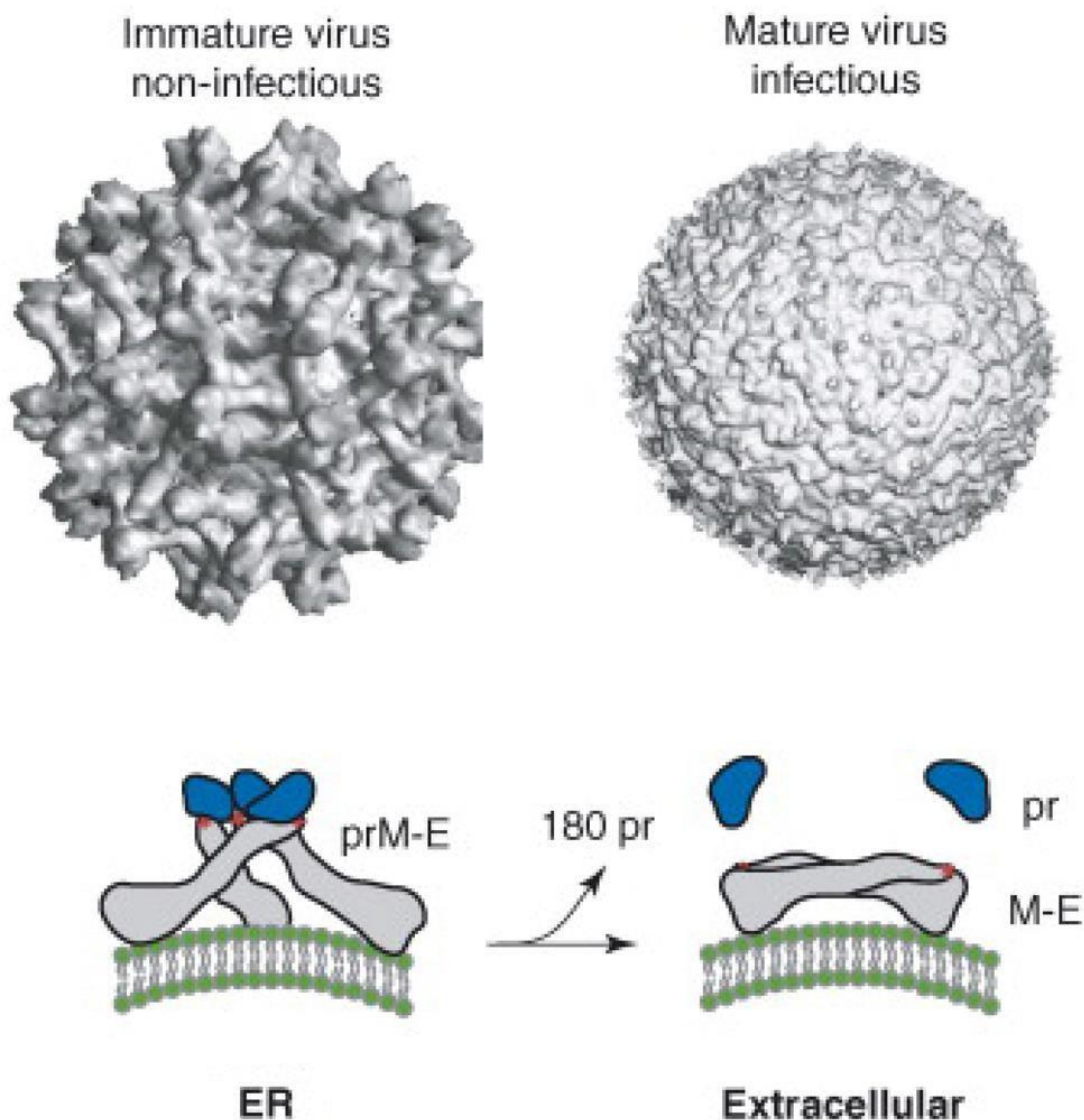


Figura 4- Estrutura da partícula viral imatura e madura. A superfície das partículas imaturas tem uma aparência irregular porque as proteínas prM e E são inicialmente montadas como pontas triméricas que se projetam para longe do envelope. No compartimento trans-Golgi, uma protease celular cliva a proteína prM para gerar a proteína M madura, que também resulta no rearranjo de trímeros da proteína E para formar dímeros que ficam planos na superfície do envelope criando a superfície lisa observada em vírions maduros e infecciosos liberados no espaço extracelular. **Fonte-** Wahala & Silva, 2011.

1.3 Transmissão, ciclo de multiplicação do DENV e sua interação com o hospedeiro humano

A transmissão do DENV se inicia após a fêmea do mosquito hematófago *Aedes aegypti* se alimentar do sangue de um hospedeiro com dengue na fase aguda e virêmica da doença. Em seguida, é iniciada a fase de incubação extrínseca, onde o vírus infecta o intestino e chega às glândulas salivares do artrópode, período que dura

cerca de 5 a 12 dias, dando-lhe a capacidade de transmitir o vírus a diversas pessoas através de sua picada, como demonstrado na Figura 5. O vetor permanece infectado pelo resto da vida, podendo infectar todos os hospedeiros nos quais ele posteriormente se alimentar (GUZMAN et al., 2016). Outra maneira de manutenção da infecção nos mosquitos é a transmissão transovariana do vírus para sua progênie, a qual também pode sustentar sua circulação nas áreas endêmicas (MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

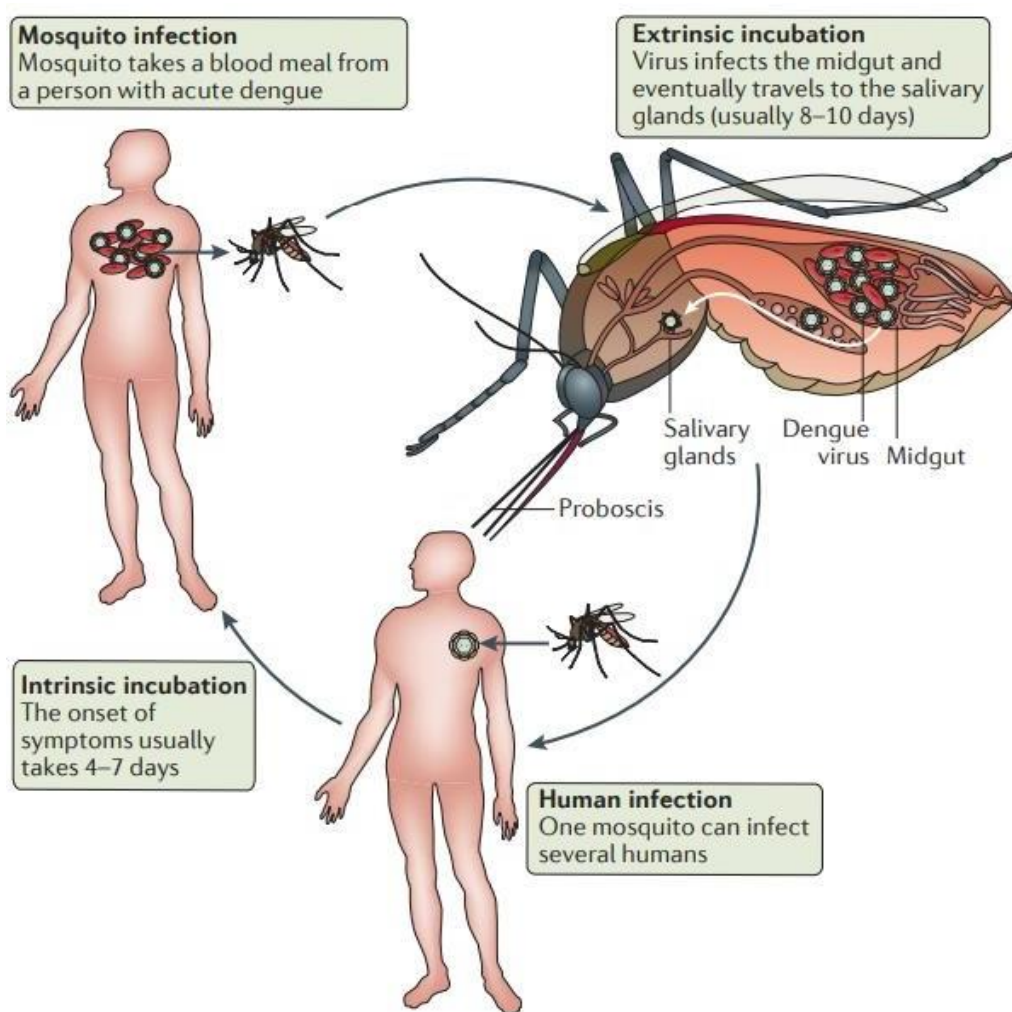


Figura 5- Ciclo urbano do vírus da dengue em humanos e mosquitos. Um mosquito *Aedes aegypti* pode ser infectado ao se alimentar de uma pessoa na fase virêmica da infecção. Durante a fase extrínseca do ciclo, os vírus da dengue infectam primeiro as células do intestino médio do mosquito e outros tecidos antes de se disseminar para as glândulas salivares. Um mosquito infectado pode então transmitir o vírus da dengue a vários hospedeiros humanos enquanto se alimenta ou tenta se alimentar. Uma vez infectado, o hospedeiro humano, leva em média de 4 a 7 dias para o início dos sintomas e para se tornar capaz de transmitir o vírus a um novo mosquito. Tanto indivíduos sintomáticos quanto assintomáticos podem transmitir o vírus aos mosquitos **Fonte-** GUZMAN et al., 2016.

No hospedeiro humano o ciclo de multiplicação do DENV tem início quando o vírus infecta e adsorve uma célula permissiva. O período de incubação intrínseco varia de 4 a 7 dias, período que coincide com o aparecimento dos primeiros sintomas da infecção. Durante a alimentação do mosquito, o DENV é inoculado na derme e epiderme, e alguns vírions podem também ser injetados diretamente na corrente sanguínea. Na pele, a injeção destas partículas resulta na infecção especialmente de macrófagos e células dendríticas residentes (células de Langerhans). Os mastócitos não são comumente infectados, mas contribuem para a imunopatogênese induzindo a liberação de mediadores (triptase e quimase principalmente) os quais contribuem para a ocorrência dos eventos vasculares característicos da doença (ST JOHN et al., 2013; 2015).

Embora o DENV apresente tropismo por um amplo espectro de linhagens celulares *in vitro*, ele se replica em apenas alguns tipos celulares *in vivo*. (SUN & KOCHER, 2013; NOISAKRAN et al., 2010). Diferentes estudos foram realizados para decifrar os locais exatos de replicação do DENV no hospedeiro humano. Sabe-se que algumas células suportam a replicação do DENV de forma consistente, enquanto outras mostraram uma suscetibilidade variável à infecção. Os órgãos/tecidos mais extensivamente estudados onde o DENV foi detectado são- pele, sangue periférico, baço, linfonodos e fígado, como demonstrado na Figura 6 (KANGWANPONG et al., 1995; MIAGOSTOVICH et al., 1997; JESSIE et al., 2004; KYLE et al., 2007; DURBIN et al., 2008; BALSITIS et al., 2009; PRESTWOOD et al., 2012; PÓVOA et al., 2014).

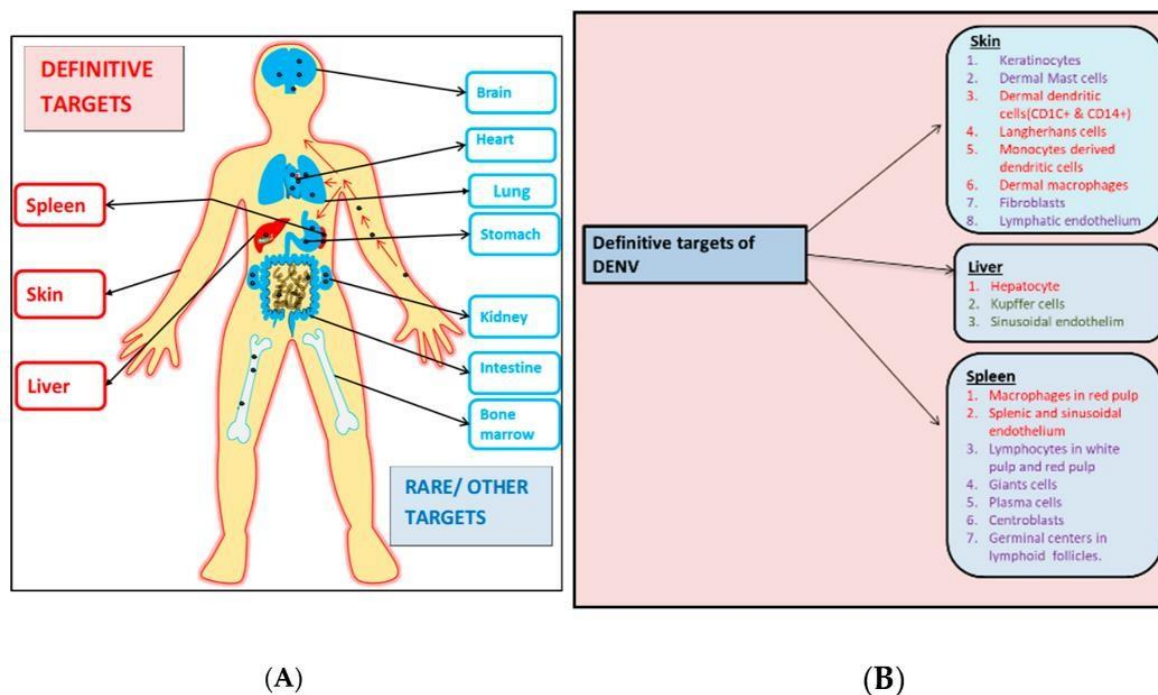


Figura 6- Representação esquemática dos vários órgãos e seus respectivos alvos celulares infectados pelo DENV. (A) Este painel representa os alvos definitivos (destacados em vermelho) e prováveis / raros (destacados em azul) do vírus durante o processo de infecção. (B) Subconjuntos celulares específicos dos órgãos definitivos infectados por DENV. As células marcadas em vermelho mostraram consistentemente estar infectadas pelo DENV, onde o vírus também se replica. Células marcadas em verde também foram encontradas como alvo do DENV, embora de forma inconsistente. As células marcadas com roxo foram consideradas positivas para DENV em alguns estudos de autópsia, mas não mostraram quaisquer sinais de replicação pelo DENV. **Fonte-** Begum et al., 2019.

Após a adsorção, o mecanismo de penetração utilizado pelo vírus é a endocitose mediada por receptor. Porém, apesar dos esforços para determinar a(s) molécula(s) responsável(is) pelo reconhecimento do DENV pelas células alvo, um receptor específico para o vírus ainda não foi identificado (CRUZ.OLIVEIRA et al., 2015). Entretanto, vários candidatos já foram propostos a partir de estudos *in vitro* com linhagens celulares e células primárias humanas, incluindo glicosaminoglicanos, lectinas do tipo C, a molécula de adesão de células dendríticas (DC-SIGN), integrinas específicas do fígado e linfonodos (L-SIGN), o receptor de manose em macrófagos, o receptor de fosfolípidios CD300a, os receptores de fosfatidilcerina das células T com domínio imunoglobulina e mucina (TIM) e Tyro3, AXI e MERTK (TAM) (NGONO; SHRESTA, 2018).

Após a endocitose, o ambiente ácido do endossoma dispara um processo irreversível de trimerização da proteína E, o que resulta na fusão das membranas

celular (endossomal) e viral, levando a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula alvo. A replicação do RNA viral de fita positiva ocorre em associação com as membranas derivadas do retículo endoplasmático onde ele é traduzido em uma grande poliproteína que, por sua vez, dá origem a polimerase dependente de RNA.

Durante o processo de replicação, cópias de uma fita antígenoma são produzidas e estas servem como molde para a produção de múltiplas cópias da fita de RNA viral sentido positivo. Após vários ciclos de tradução, níveis elevados das proteínas C, prM e E são sintetizados. Essas proteínas são arranjadas juntamente com o genoma viral nas membranas do retículo endoplasmático da célula hospedeira, dando origem a progênie viral, que é transportada pelo complexo de Golgi e secretada posteriormente pelo processo de exocitose, como demonstrado na Figura 7 (GUZMAN et al., 2016).

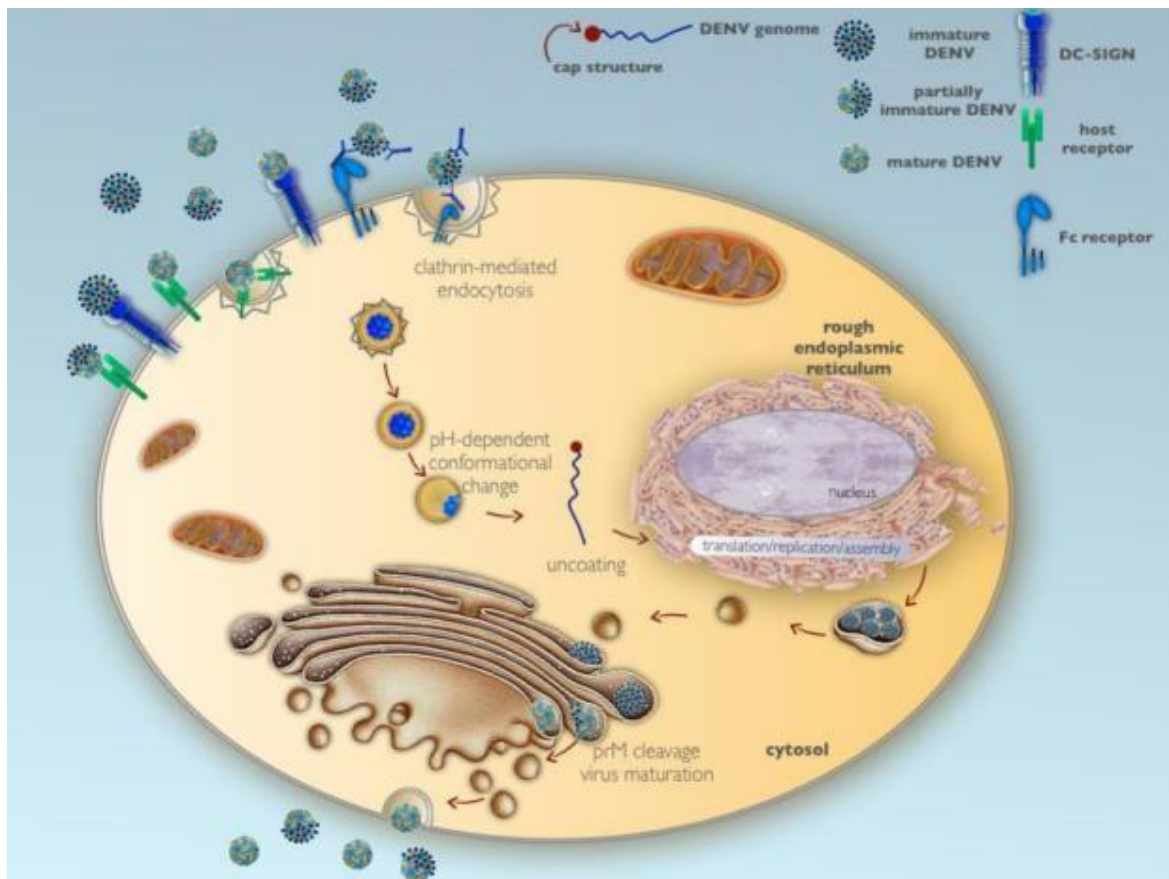


Figura 7- Ciclo de replicação do vírus da dengue no hospedeiro humano. O DENV se liga e adsorve nas células por meio de um ou mais receptores (ainda não caracterizados) pelo processo conhecido como endocitose mediada por receptor. A acidificação endossomal resulta em uma trimerização irreversível da proteína E viral, expondo o domínio de fusão. Não revestido, o RNA viral (vRNA) é traduzido no retículo endoplasmático (RE), onde é processado em três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais. Depois que o complexo de replicação viral é sintetizado, a tradução

do vRNA é finalizada e começa a síntese do RNA. Posteriormente, rodadas sucessivas de translação são seguidas pela montagem no RE. O vírion é maturado no compartimento de Golgi e sai pela via secretora do hospedeiro (processo de exocitose). **Fonte-** Green et al., 2014.

Vale lembrar que, uma vez que o vírus adsorve na célula e se replica, os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são ativados gerando uma resposta à infecção. Esta ativação ocorre com a interação destes receptores com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), o que inclui diversos componentes virais, como o RNA viral ou intermediários de replicação (dsRNA e proteínas virais, por exemplo) (COSTA et al., 2013).

Entre os PRRs mais importantes na resposta imune contra a infecção pelo DENV estão os receptores endossomais do tipo Toll (TLRs), particularmente TLR-3, TLR-7 e TLR-8, que quando ativados representam algumas das primeiras linhas de defesa no reconhecimento imunológico inato de moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA), RNA de fita simples (ssRNA) ou RNA modificado.

Experimentos em primatas não humanos infectados com DENV demonstraram que a administração de agonistas de TLR-3, TLR-7 e TLR-8 resultaram em diminuição significativa da replicação viral e aumento da produção de quimiocinas pró-inflamatórias, bem como aumento do título de anticorpos anti-DENV no soro, indicando um papel protetor da ativação dos TLRs durante a infecção pelo DENV (SARIOL et al., 2011).

Durante a infecção, o TLR-3 reconhece o RNA viral após acidificação endossomal e induz a produção de CXCL-8 e IFN- α/β . Este reconhecimento resulta na fosforilação do interferon- β indutor de adaptador que contém o domínio TIR, um adaptador em resposta à ativação de receptores do tipo pedágio (TRIF). O TRIF interage com os fatores TRAF3 e TRAF6 associados ao receptor do TNF. TRAF3 interage com a quinase 1 de ligação de TANK e a quinase I κ 1 (Ikk1), resultando na fosforilação de IRF3. TRAF6 sinaliza por meio da associação com TAK1, ativação de AP-1 e início da desfosforilação Ikk1 / Ikk2 de I κ B, levando à ativação de NF κ B. A translocação nuclear de IRF3, AP-1 e NF κ B induz produção de IFN- α/β , genes estimuladores de interferon (ISGs) e quimiocinas (LEE et al., 2012).

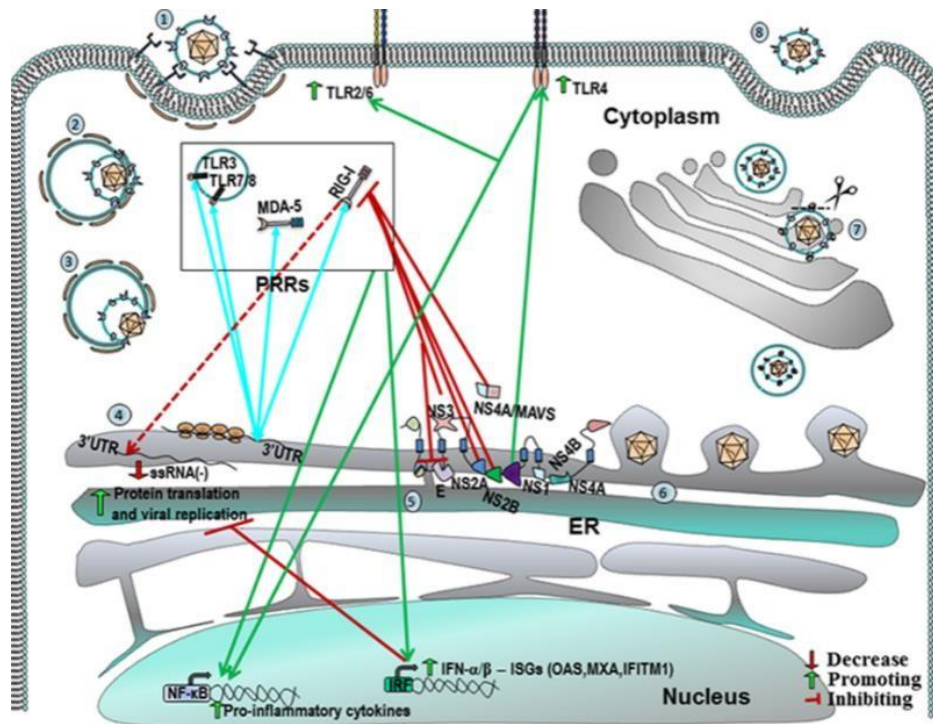


Figura 8- Resposta imune inata contra a infecção pelo DENV. Após a infecção por DENV, ocorre um perfil de expressão alterado de certos PRRs para promover ou inibir a replicação viral. 1) Fixação do vírus na célula-alvo; receptores celulares para o vírus são apresentados. 2) O baixo pH da vesícula endocítica induz a fusão da membrana resultando na liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma (3); a desmontagem do vírus resulta na liberação do RNA viral no citoplasma. 4) e 5) Tradução de proteínas de vírus e replicação viral. 6) Montagem. 7) Maturação. 8) Secreção de vírus. As setas vermelhas, verdes e azuis são explicadas no canto inferior direito. **Fonte-** Urcuqui-Inchima et al., 2017.

Outros dois componentes fundamentais da imunidade inata, importantes na resposta a infecção pelo DENV como demonstrado na Figura 8, são o gene induzível por ácido retinóico I (RIG-I) e fator de diferenciação de melanoma 5 (MDA5) (URCUQUI-INCHIMA et al., 2017). Igualmente importantes estes PRRs são ativados durante a infecção contribuindo para a indução de IFN- β (NASIRUDEEN et al., 2011). Um papel importante desses sensores citoplasmáticos é a diferenciação entre o RNA viral e da célula hospedeira (ZINZULA et al., 2013). Em particular, MDA5 é capaz de distinguir o RNA do hospedeiro do RNA viral com base em uma metilação de ribose 2'-O encontrada no mRNA do hospedeiro.

A ativação de RIG-I desencadeia fatores reguladores de interferon downstream e outros fatores de transcrição que participam na indução de IFN tipo I e produção de ISGs em células infectadas (YONEYAMA E FUJITA, 2007). Este receptor contém um domínio de recrutamento de caspase N-terminal (CARD) envolvido na ligação da molécula adaptadora, MAVS (proteína de sinalização antiviral mitocondrial), que

interage com o estimulador de genes do interferon (STING). Uma vez ativada, MAVS oligomeriza e atrai múltiplas ubiquitina E3 ligases, como TRAF3 e TRAF6 para ativar a cascata de sinalização. A ativação de TRAF3 resulta na translocação de IRF3 e IRF7 para o núcleo para induzir a transcrição de IFN- α/β , conforme descrito acima. Além disso, a ativação do TRAF6 resulta em translocação de NF κ B para o núcleo e produção de IFN- α/β . Ambos, RIG-I e MDA5, foram encontrados em sinergia com TLR-3 para limitar a replicação do DENV *in vitro* (NASIRUDEEN et al., 2011).

Os IFNs são uma família diversa de citocinas pleiotrópicas consistindo basicamente nos tipos I (IFN- α , IFN- ω e IFN- β), tipo II (IFN- γ) e tipo III (IFN- λ 1, 2 e 3) que desempenham um papel essencial na imunidade inata, inibindo a replicação e disseminação de patógenos virais, bacterianos e parasitários. Eles também modulam as respostas imunes e exercem efeitos antiproliferativos em alguns tipos de células. Como resultado dessas funções, os IFNs são usados na clínica para tratar certas infecções virais, alguns tipos de câncer e doenças autoimunes a exemplo da esclerose múltipla. Sabidamente, os interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β) são produzidos em resposta à detecção do RNA do DENV por vários receptores de reconhecimento de patógenos (SHRESTA et al., 2004) e desempenham papel crucial na imunidade antiviral, como demonstrado na Figura 9 abaixo.

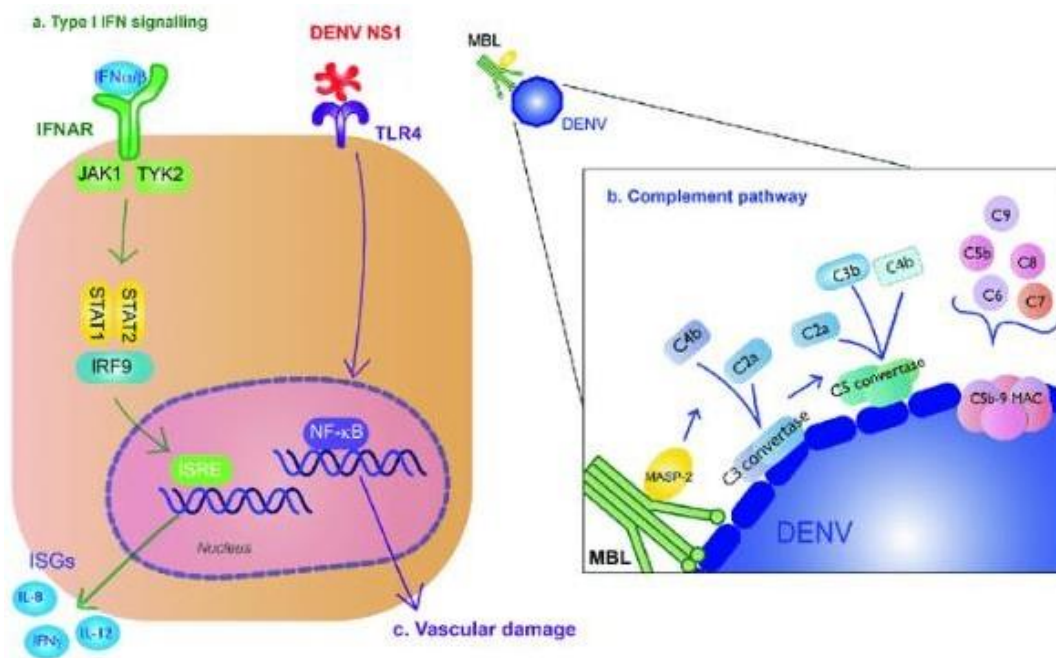


Figura 9- Resposta de IFN tipo I e ativação do complemento na infecção por DENV. (a) Sinalização de IFN tipo I (verde)- A ligação de IFN-I a receptores de IFN α / β (IFNARs) estimula a expressão do ISG que resulta em atividade antiviral. Essas citocinas se ligam à superfície das células próximas ou

infectadas, ativando a via da Janus quinase (JAK) / transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT). JAK1 e tirosina quinase 2 (TYK2) levam à fosforilação e dimerização de STAT1 e STAT2, que forma um complexo com o fator regulador de interferon 9 (IRF9). O complexo será transferido para o núcleo onde induzem a transcrição de ISGs pelo elemento de resposta estimulada por IFN (ISRE). (b) Via do complemento (azul)- O reconhecimento de DENV pelo complexo de lectina ligadora de manose (MBL) irá induzir a ativação do complemento. A clivagem de C4 e C2 pela serina protease-2 associada a MBL (MASP-2) faz a C3 convertase e inicia a cascata de complemento clássica, incluindo a formação de C5 convertase e o complexo de ataque de membrana C5b-9 (MAC) para induzir a lise, recrutamento de fagócitos e inflamação. (c) A ligação de NS1 a TLR4 irá induzir danos vasculares (roxo). **Fonte-** Uno & Ross, 2018.

As interações entre os PAMPs e seus PRRs correspondentes ativam várias vias de sinalização que finalmente levam à produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente interferon tipo I (IFN-I) (BOO e YANG 2010). Este conjunto de eventos induz a produção de inúmeras proteínas antivirais e pró-inflamatórias. Os IFN- α/β secretados pelas células infectadas desencadeiam sinais de alerta para células adjacentes de que uma infecção está ocorrendo, bem como uma indução autócrina de respostas antivirais celulares.

A sinalização desencadeada pela interação entre as moléculas de IFN e seus receptores ativa JAK / STAT pela fosforilação do adaptador de moléculas TYK2 e JAK1. A ativação dessas moléculas adaptadoras resultam na fosforilação e dimerização de vários transdutores de sinal e moléculas ativadoras de transcrição (STAT), incluindo STAT1, STAT2, STAT3 e STAT5. O complexo de sinalização formado por STAT1 e STAT2 junto com IRF9 em resposta a ativação de IFNAR é o fator de gene estimulador de interferon 3, complexo que se transloca para o núcleo e se liga a elementos de resposta estimulados por IFN localizados na região promotora de genes estimulados por IFN.

O sistema complemento também é uma parte importante da resposta imune inata ao vírus. A via da lectina de ligação à manose (MBL) induz proteção neutralizante contra o DENV. MBL se liga a superfícies contendo glicanos de manose, e esta proteína reconhecerá a superfície do DENV (AVIRUTNAN et al., 2011). O reconhecimento do DENV pelo complexo MBL irá induzir a clivagem de C4 e C2 pela serina protease-2 associada a MBL e depositar C4b e C2a na superfície do vírion, formando a C3 convertase (THIEL et al., 1997). A seguinte cascata de complemento clássica inclui a formação de C5 convertase e o complexo de ataque de membrana

C5b-9 (MAC) para induzir lise, recrutamento de fagócitos e inflamação (FUJITA & MATSUSHITA, 2004).

1.4 Patogênese

Desde 2009 a OMS classifica a dengue de acordo com a presença e ausência de sinais de alarme (dor abdominal, persistência de vômito, sangramento em mucosas, apatia, inquietude, hepatomegalia, aumento de extravasamento plasmático e plaquetopenia). A doença é considerada grave quando o paciente apresenta intenso extravasamento plasmático e hemorragia, acompanhados de dano aos órgãos (WHO, 2009). O curso da doença é influenciado por diversos fatores, inerentes ao hospedeiro e ao vírus.

Relacionado aos fatores virais, diversos estudos sugerem que o desenvolvimento da doença varia de acordo com o sorotipo e genótipo do vírus. Diferenças na virulência entre linhagens virais e especialmente entre genótipos virais desempenham um papel importante no resultado da doença (GUZMAN et al., 2016). O genótipo III do DENV-3, por exemplo, que inclui isolados da África Oriental, Sul da Ásia e América Latina, tem sido associado com um aumento de casos de dengue grave nessas regiões (DIAZ F. J. et al., 2006). Estes estudos indicam que certos vírus podem causar doenças mais graves na população. No entanto, mecanismos explicando as maiores proporções de manifestação de casos de dengue grave durante a infecção com estes genótipos virais ainda não foram muito bem esclarecidos (RICO-HESSE, 2010).

Um outro estudo, realizado na Malásia, demonstrou que manifestações clínicas não graves foram comumente observadas em pacientes infectados com DENV-1 e DENV-3. Enquanto isso, os pacientes com infecção por DENV-2 apresentaram sinais de alerta significativos e desenvolveram dengue grave. Além disso, mialgia e artralgia foram altamente prevalentes entre as infecções por DENV-3. A comparação das manifestações clínicas específicas do genótipo mostrou que o DENV-2 Cosmopolitan foi significativamente comum entre pacientes com dengue grave. Uma associação também foi encontrada entre o genótipo I do DENV-3 e mialgia e o genótipo III e artralgia (SUPPIAH et al., 2018).

Pinheiro e colaboradores (2018) demonstraram que a capacidade de replicação ou fitness viral do DENV, está relacionada não somente à sua habilidade de replicação

no mosquito e no hospedeiro humano, ou à inibição do sistema IFN, por exemplo, mas também com a resposta imunológica que o vírus desencadeia. Segundo a pesquisa, uma linhagem que ativa menos o sistema imunológico é menos combatida e conseqüentemente, consegue se multiplicar mais no hospedeiro humano, o que aumenta a chances de infecção produtiva de mosquitos durante o repasto no indivíduo infectado (PINHEIRO et al., 2018). Além disso o DENV modula de forma satisfatória o sistema imune hospedeiro, seja inibindo a produção e sinalização de IFN-I nas células infectadas (RODRIGUEZ-MADOZ et al., 2010), inibindo a fosforilação de STAT1 (MUNOZ-JORDAN et al., 2003) ou degradando STAT2 (DONG et al., 2010).

Tratando-se dos fatores associados ao hospedeiro, são considerados o status imune e genético do mesmo, bem como sua idade. Estudos demonstram que, a primeira infecção pelo DENV se desenvolve de forma mais grave em indivíduos com idade avançada devido a supressão do sistema imune. Tratando-se de indivíduos mais jovens, a forma grave da doença se desenvolve quando estes já foram sensibilizados pelo DENV (GUZMAN et al., 2016).

Diversas teorias têm sido descritas a fim de justificar a ocorrência dos quadros de dengue grave durante infecções secundárias por sorotipos virais distintos. Uma delas sugere que a evolução da dengue sem sinais de alarme para a dengue grave está diretamente associada à produção de anticorpos subneutralizantes contra o primeiro sorotipo viral os quais não conseguem neutralizar a infecção do segundo vírus e conseqüentemente inibir sua entrada nas células da linhagem fagocítica mononuclear (monócitos e macrófagos) expressando receptores de imunoglobulinas do tipo Fc (FcRs). Neste caso, a infecção heteróloga resulta em um maior número de células infectadas, fenômeno conhecido como intensificação dependente de anticorpos ou ADE, do inglês Antibody-Dependent Enhancement demonstrado na Figura 10 (NGONO & SHRESTA, 2018).

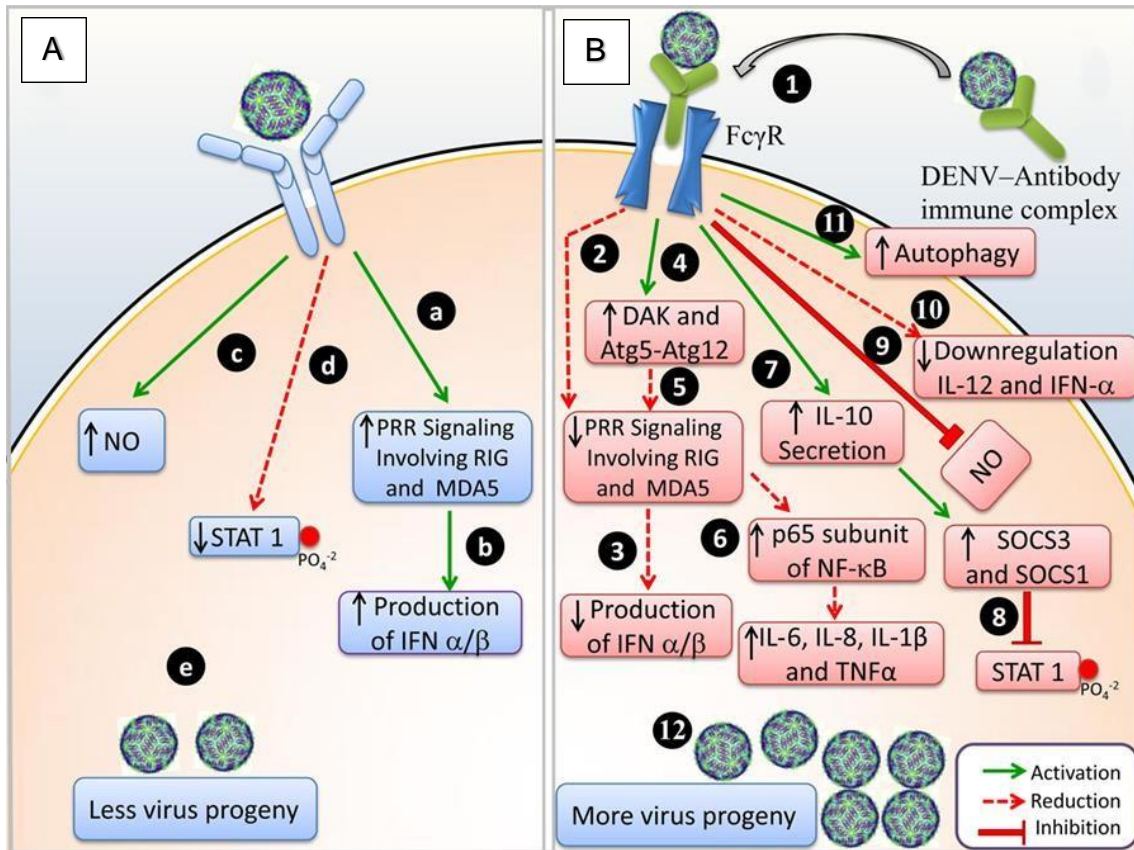


Figura 10- Resposta imunológica na infecção primária e secundária. Eventos de resposta imune durante a infecção primária e secundária (ADE) pelo vírus da dengue. (A) Infecção por DENV- (a) após a entrada viral, a sinalização do receptor de reconhecimento de padrão (PRR) ativa RIG-1 e MDA-5, (b) IFN- α/β são produzidos, (c) a produção de óxido nítrico (NO) é regulada positivamente, (d) a fosforilação de STAT1 é reduzida e (e) menos progênie viral é produzida. (B) Infecção por DENV-ADE- (1) o complexo imune vírus-anticorpo liga-se a Fc γ R e é transportado dentro da célula; (2) a sinalização PRR não está envolvida e RIG-1 e MDA-5 são suprimidos; (3) a produção de IFN- α/β é inibida, (4) a regulação negativa de DAK e Atg5-Atg12; (5) interrompe a cascata de sinalização RIG-I / MDA-5; (6) expressão aumentada de p65 de NF κ B e degradação de I κ B resultou em níveis elevados de IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF- α (citocinas pró-inflamatórias); (7) a secreção de IL-10 aumenta SOCS-3 e SOCS-1; (8) por sua vez atenua a fosforilação de STAT1; (9) regulação negativa de IL-12 e IFN- γ ; (10) a produção de NO é suprimida; (11) a autofagia é aumentada; e (12) mais progênie viral é produzida. **Fonte-** Ngonon & Shrestha, 2018.

Além de um maior número de células infectadas, estudos demonstram que o reconhecimento do imunocomplexo viral (dengue-anticorpo) ocorre de maneira distinta na célula hospedeira infectada se comparado à infecção primária. O imunocomplexo leva à ativação de vias anti-Inflamatórias / imunomoduladoras dependentes da ativação de SOCS e produção de IL-10 as quais culminam em subversão das respostas antivirais das células infectadas mediadas por IFN- I. Como

resultado, uma maior replicação viral é observada nessas células culminando na liberação de maior progênie viral e doença. Este fenômeno é conhecido como ADE intrínseco (ADEi) e já foi demonstrado experimentalmente para diversas infecções como a dengue e leishmaniose (HALSTEAD et al. 2010; COSTA et al., 2014, KHANDIA et al 2018).

Uma outra explicação para o agravamento da doença em infecções secundárias heterólogas, é a “Teoria do pecado antigênico original” demonstrada na Figura 11, onde as células T específicas para o sorotipo da infecção primária são reativadas sofrendo expansão clonal maior que células T naive, o que prejudica a eliminação do segundo sorotipo viral. Resumidamente, as células T estão presentes em grande quantidade, mas são ineficientes, visto que são altamente específicas para o sorotipo anterior (ST. JOHN, 2013).

Estudos clínicos mostraram uma maior frequência de células T CD8 de baixa afinidade e que respondem a sorotipos de reatividade cruzada do DENV no sangue de pacientes com dengue grave, comparado com pessoas com dengue sem sinais de alarme. Também foi verificada alteração no perfil de citocinas em células T CD8 específicas para o DENV em pacientes com a forma grave da doença (NGONO & SHRESTA, 2018).

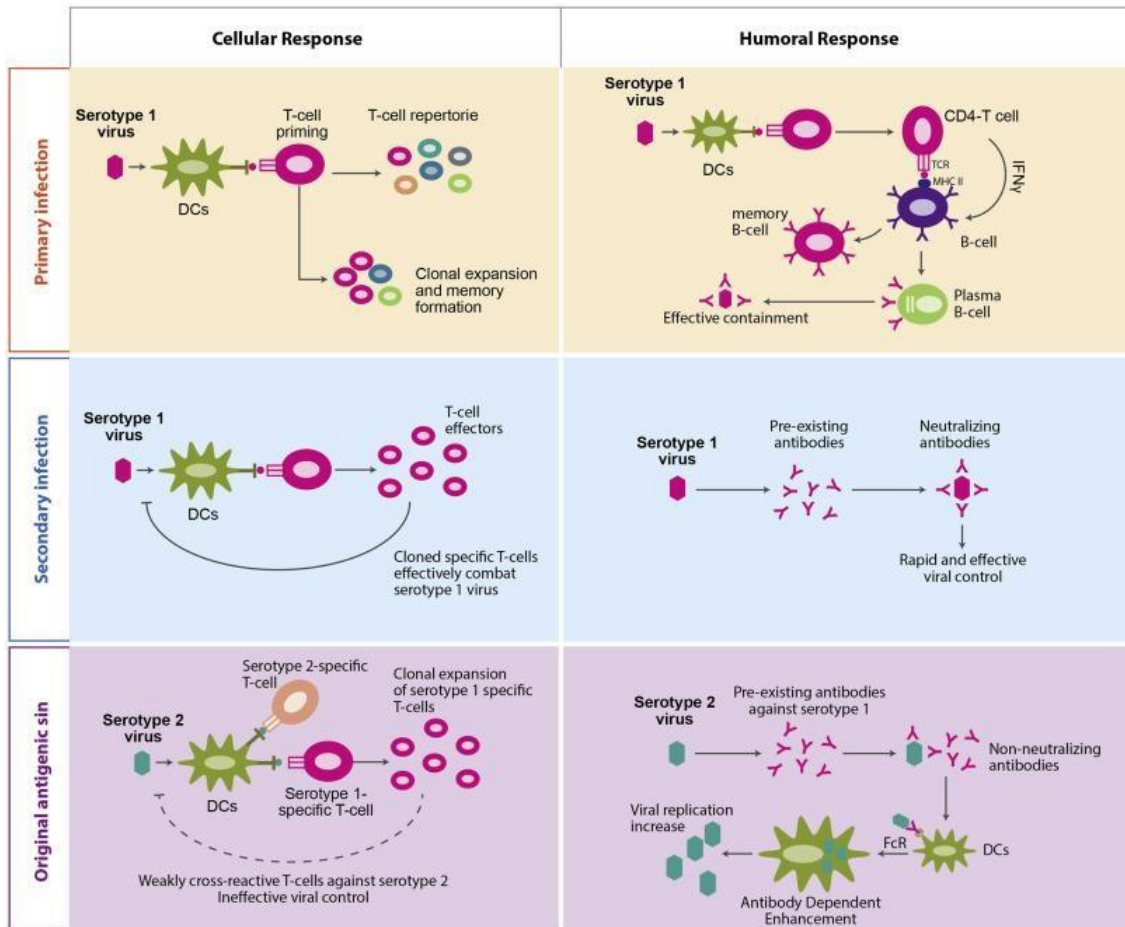


Figura 11- Pecado antigênico original. Resposta à exposição a dois sorotipos de vírus semelhantes. O antígeno do sorotipo 1 é processado e apresentado pelas células dendríticas (DCs), levando à iniciação dos linfócitos B e T e subsequente expansão clonal de linfócitos específicos do sorotipo 1. Essa expansão clonal é reativa cruzada e ocorre mesmo após a exposição ao sorotipo 2, tornando uma resposta ineficaz contra o sorotipo 2. **Fonte-** Anup et al., 2017.

Independente do mecanismo, se mediado por anticorpos ou ativação de células de memória, ou os dois, a maior replicação viral e o número aumentado de células infectadas observado durante as infecções secundárias heterólogas resulta em maior inflamação, caracterizada por produção aumentada de mediadores inflamatórios por parte do hospedeiro, fenômeno conhecido como “cytokine storm” ou tempestade de citocinas, as quais culminam na hiperativação endotelial e consequentemente resultam nos eventos vasculares associados à infecção os quais podem culminar em morte do indivíduo infectado. Polimorfismos para algumas moléculas, como CD209, JAK e IFNs por exemplo também podem interferir direta ou indiretamente no desenvolvimento da doença (SILVA, 2010; SAKUNTABHAI, 2005). A Figura 12 a seguir reúne os principais eventos associados a patogênese da dengue.

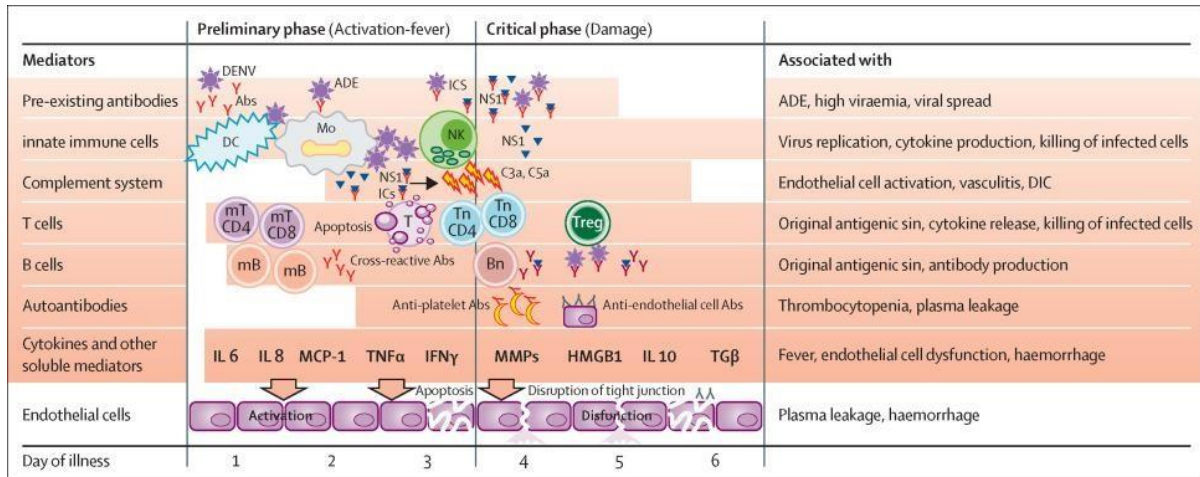


Figura 12- Patogênese da infecção pelo DENV. Os possíveis mecanismos incluem a presença de anticorpos preexistentes; infecção e ativação de células imunes inatas; ativação do sistema complemento, células T e células B; e a produção de autoanticorpos. Citocinas e mediadores solúveis, sequencialmente liberados por diferentes células em consequência da ativação imune, desempenham um papel importante na patogênese da doença, mediando o extravasamento de plasma através das células endoteliais. Os níveis aumentados de algumas citocinas pró-inflamatórias que atuam no endotélio vascular não necessariamente coincide cronologicamente com este extravasamento, uma vez que a ativação imune precede a defervescência e o início do extravasamento plasmático. **Fonte-** Guzman & Harris, 2015.

O curso da dengue é moldado de acordo com diversos fatores, que podem combater a infecção ou ocorrer de forma exacerbada, causando ainda mais danos ao organismo que chega a sucumbir em alguns casos (Guzman & Harris, 2015).

1.5 Manifestações clínicas, diagnóstico, tratamento e prevenção

Entre 1975 e 2009 a dengue foi classificada em febre do dengue (FD) e febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue (FHD/SCD) (BANDYOPADHYAY et al., 2006), porém com as limitações na aplicação dessa classificação outro sistema foi implementado e incorporado no Guia de Orientações para Diagnóstico, Tratamento, Prevenção e Controle da Dengue pela OMS em 2009, onde passou a ser classificada de acordo com a gravidade da doença, em dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave, como demonstrado na Figura 13.

Considera-se caso suspeito de dengue o quadro de paciente que viva ou tenha viajado nos últimos 14 dias para área onde esteja ocorrendo transmissão de dengue ou tenha a presença de *Aedes aegypti*, que apresenta febre, usualmente entre dois e

sete dias, e apresente duas ou mais das seguintes manifestações- náusea, vômitos; exantema; mialgias, artralgia; cefaleia, dor retro-orbital; petéquias ou prova do laço positiva; leucopenia. Na dengue com sinais de alarme o paciente apresenta um ou mais dos seguintes sinais de alarme no período de defervescência da febre- dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdome; vômitos persistentes; acúmulo de líquidos (ascite, derrame pleural, pericárdico); sangramento de mucosas; letargia ou irritabilidade; hipotensão postural (lipotímia); hepatomegalia maior do que 2 cm; aumento progressivo do hematócrito (OMS, 2009).

Por fim, na dengue grave o paciente apresenta uma das seguintes condições- choque devido ao extravasamento intenso de plasma evidenciado por taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar igual ou maior a três segundos, pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente ≤ 20 mmHg; hipotensão arterial em fase tardia, acumulação de líquidos com insuficiência respiratória. Sangramento grave, segundo a avaliação do médico (exemplos- hematêmese, melena, metrorragia volumosa, sangramento do sistema nervoso central); comprometimento grave de órgãos tais como- dano hepático (AST ou ALT > 1000), alteração da consciência (sistema nervoso central), miocardite (coração) ou outros órgãos (OMS, 2009).

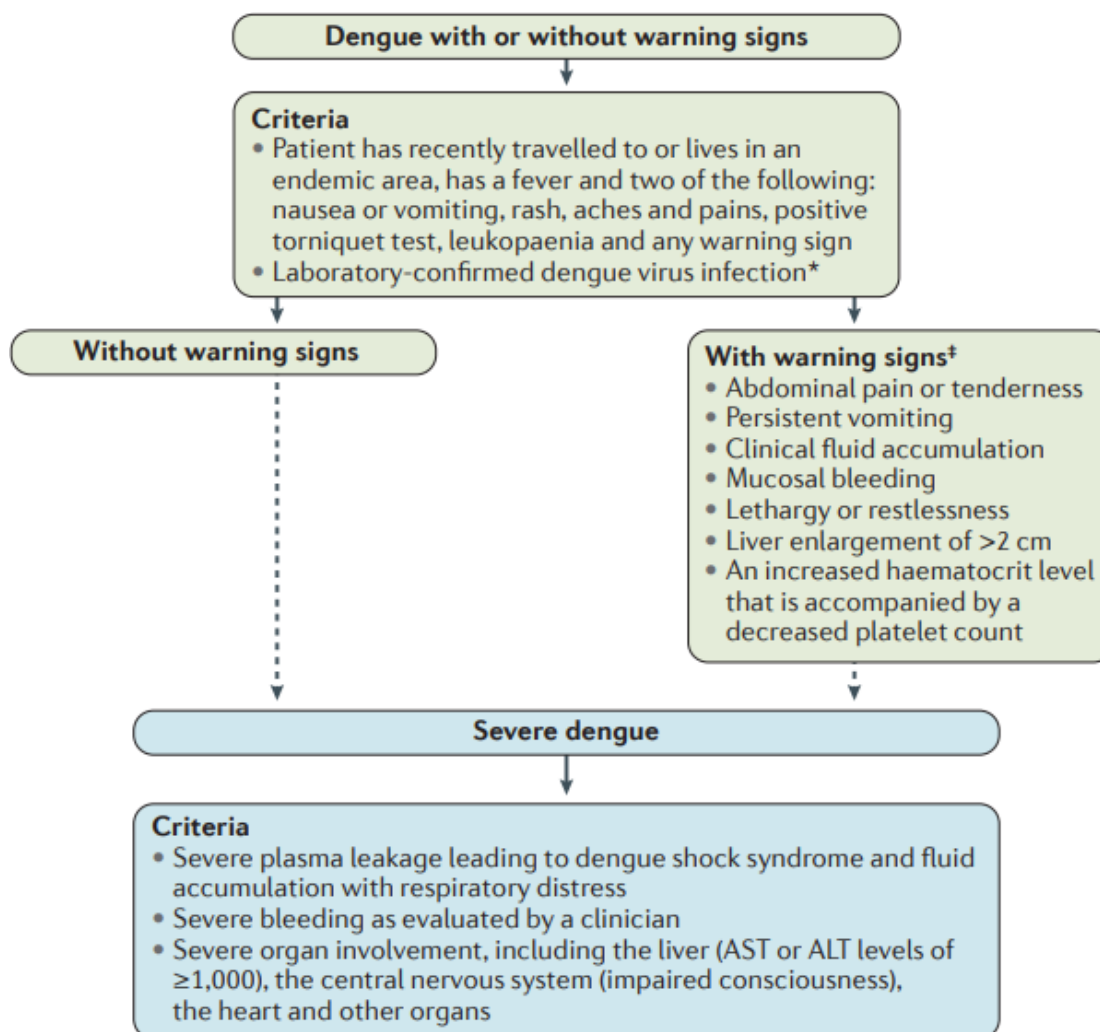


Figura 13- Classificação clínica da dengue. A dengue é classificada como dengue com ou sem sinais de alarme e dengue grave. O diagnóstico de dengue requer a presença de febre com dois ou mais achados clínicos ou sinais de alarme. Evidências clínicas e laboratoriais são requeridas para o diagnóstico preciso da doença. **Fonte-** OMS, 2009.

Os sintomas da infecção, demonstrados na Figura 14, normalmente desaparecem dentro de quatro a sete dias (KYLE & HARRIS, 2008). O agravamento da doença é caracterizado pela intensificação dos sinais de alerta, extravasamento plasmático para os espaços intersticiais, hemorragia e comprometimento dos órgãos, especificamente.

A análise transcriptômica do sangue de pacientes infectados pelo DENV identificou duas fases de expressão gênica durante o estágio febril da doença. Na fase aguda foram identificados genes associados a resposta inata, a quimiotaxia e a

atividade da via do complemento. Ao final da fase aguda são expressos genes associados com o ciclo celular e reparo do DNA (SUN et al., 2013; SIM & HIBBERD, 2016). No estágio de defervescência a resposta imune antiviral diminui rapidamente, e transcritos dos genes envolvidos na biossíntese, metabolismo e nas respostas adaptativas se tornam protuberantes (SIMMONS et al., 2007). As manifestações hemorrágicas aparecem geralmente no período de defervescência quando a resposta imune do hospedeiro está bem estabelecida e a viremia está diminuindo rapidamente (SIM & HIBBERD, 2016).

Alterações no perfil de proteínas imunomoduladoras produzidas durante o curso da doença estão envolvidas nas manifestações clínicas da dengue (GREEN & ROTHMAN, 2006; MURPHY & WHITEHEAD, 2011; LEE et al., 2016). Fatores solúveis produzidos por células imunes, plaquetas e células endoteliais e do estroma na forma de citocinas e quimiocinas agem como moléculas sinalizadoras que atuam orquestrando a diferenciação/proliferação celular e humoral, modulando assim a resposta do hospedeiro à infecção. (FINK et al., 2006; LEE et al., 2016).

Mediadores lipídicos vasoativos liberados por mastócitos na adjacência dos vasos sanguíneos durante a infecção pelo DENV, incluindo leucotrienos e proteases (quimases) também participam da patogênese da doença contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular (ST JOHN et al., 2013). Costa e colaboradores (2017) demonstraram que a ativação das células NK durante a infecção resulta na produção de IFN- γ e TNF- α os quais foram capazes de controlar a replicação viral, contribuindo para manifestações mais brandas (COSTA et al., 2017).

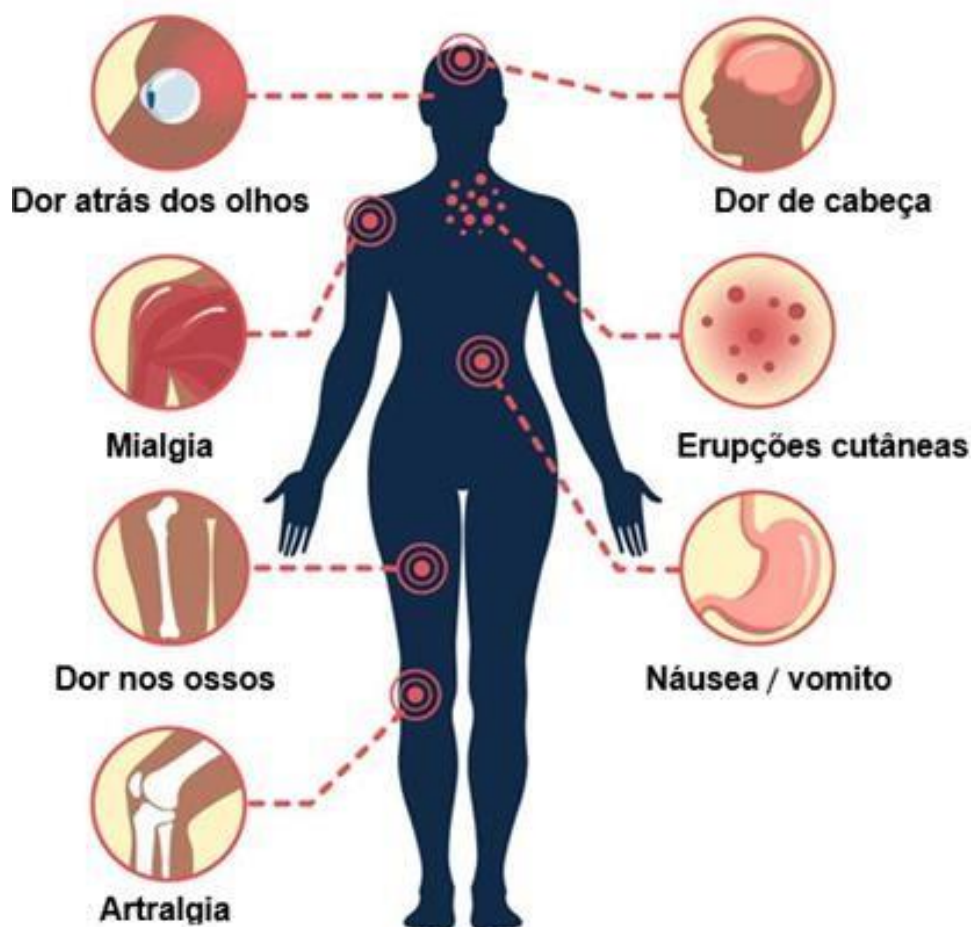


Figura 14- Sintomas da dengue. As manifestações clínicas da dengue incluem dor retro-orbital, mialgia, artralgia, dor nos ossos, erupções cutâneas, náusea e vômito. **Fonte-** Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2020.

As causas da transição de um quadro de dengue sem sinais de alarme para um quadro de dengue grave resultam de uma complexa interação de fatores inerentes ao hospedeiro e ao DENV (YANG et al., 2018). A admissão precoce em uma unidade de internação e a administração oportuna de cuidados de suporte têm melhorado os desfechos clínicos e reduzido a mortalidade em pacientes com dengue grave (OMS, 2012). Entretanto, prever a progressão da doença se faz cada vez mais necessário uma vez que os sinais de alerta são baseados em parâmetros clínicos que muitas vezes se desenvolvem mais tardiamente durante o curso da doença e apresentam sensibilidade limitada, levando a morbidade e mortalidade contínuas (ALEXANDER et al., 2011; SRIKIATKHACHORN et al., 2011).

Diversos grupos de pesquisa têm concentrado seus esforços na busca por

candidatos a biomarcadores para a gravidade da dengue. Na Figura 15 a seguir estão as várias categorias de candidatos a biomarcadores com potencial para predição de progressão da dengue para sua forma grave.

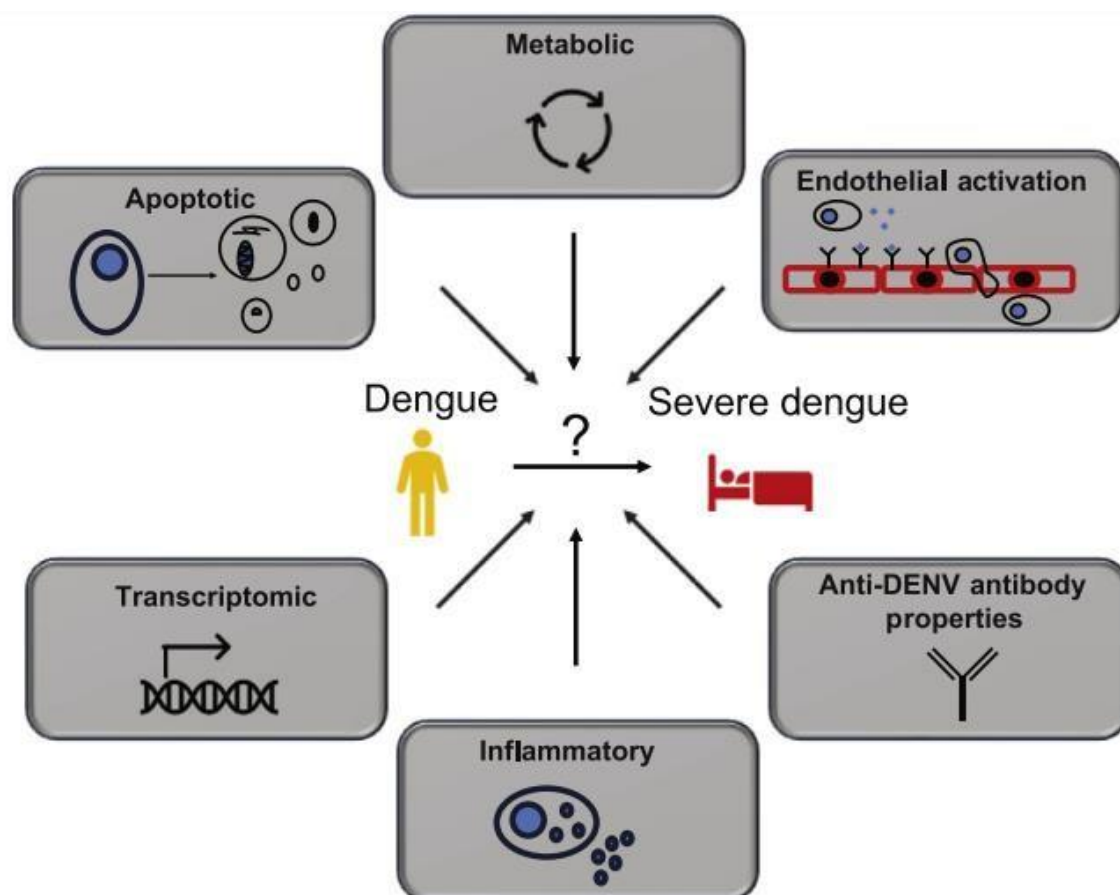


Figura 15- Esquema das principais categorias de candidatos a biomarcadores para predições acerca da progressão da dengue. A classificação da dengue, associada com o uso de biomarcadores, mais sensíveis e satisfatoriamente mensuráveis pode contribuir para um manejo adequado. **Fonte-** Robinson & Einav, 2020.

Os marcadores moleculares se concentram principalmente em análises transcriptômicas de amostras de sangue humano e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (HOANG et al., 2010; LONG et al., 2009; POPPER et al., 2012; SUN et al., 2013) ou de células primárias infectadas com DENV (BECERRA et al., 2009). Dois estudos de coorte independentes em regiões endêmicas de dengue identificaram que os níveis de anticorpos anti-DENV pré-infecção são um importante fator de risco para a gravidade da doença (KATZELNICK et al., 2017; SALIE et al., 2018). Quimase, uma serina protease e enzima conversora de angiotensina liberada

dos mastócitos após sua ativação por anticorpos anti-DENV, também foi proposta como um biomarcador candidato para gravidade da dengue (ST JOHN et al., 2013). Uma triagem metabolômica de amostras de soro de pacientes com dengue no início do período febril via cromatografia líquida e espectrometria de massa (LC-MS) identificou recentemente ~20 metabólitos que são significativamente aumentados em pacientes com dengue grave em relação àqueles com dengue sem sinais de alarme (CUI et al., 2016). Alguns desses biomarcadores estão atualmente passando por uma validação adicional em coortes prospectivas maiores (ROBINSON & EINAV, 2020).

Atualmente o diagnóstico da dengue inclui a confirmação laboratorial da infecção, baseado na sorologia, PCR em tempo real (RT-PCR) ou isolamento viral, associado à presença de quadro clínico sugestivo da doença. Os testes sorológicos permitem a detecção de anticorpos específicos do tipo IgM, que podem ser detectados a partir do segundo dia após o aparecimento dos sintomas (sendo que o período mais indicado para essa investigação sorológica é a partir do 5º dia) e do tipo IgG, a partir do sexto dia. Dada a confirmação da doença, a notificação deve ser feita ao Ministério da Saúde em até 24 horas (Ministério da Saúde, 2020). A sensibilidade de cada abordagem é influenciada pela duração da doença do paciente, como demonstrado na Figura 16 a seguir.

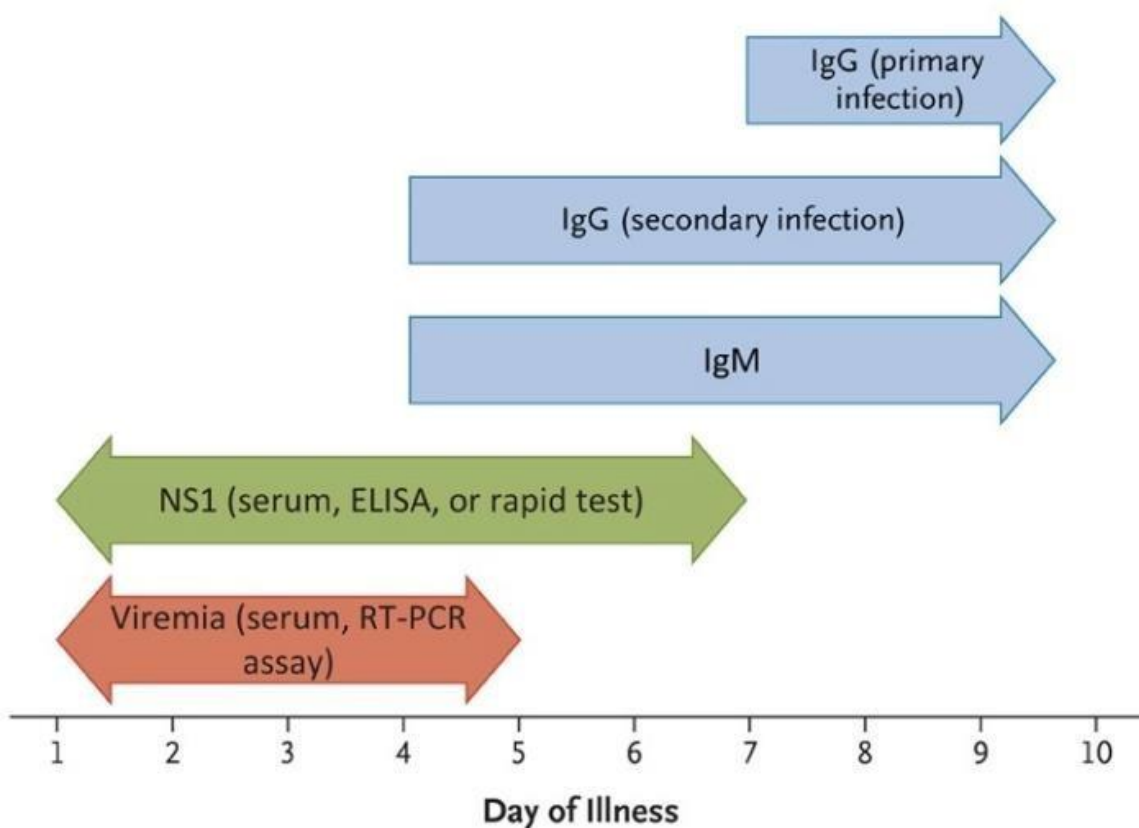


Figura 16- Opções de diagnóstico laboratorial em um paciente com suspeita de infecção por dengue. A detecção de ácido nucleico viral, proteína não estrutural 1 (NS1) ou soroconversão de IgM é um achado confirmatório em pacientes nos quais a dengue é um possível diagnóstico. O dia 0 é o primeiro dia em que o paciente notou algum sintoma durante a doença. ELISA denota ensaio de imun absorção enzimática e reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa RT-PCR.
Fonte- Simons et al., 2012.

Durante a fase febril, a detecção de ácido nucleico viral no soro por meio de ensaio de RT-PCR ou detecção da proteína NS1 expressa pelo vírus por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) ou o teste rápido de fluxo é suficiente para um diagnóstico confirmatório. Para infecções primárias em pessoas que não foram infectadas anteriormente (o que é típico no caso da maioria dos viajantes), a sensibilidade diagnóstica da detecção de NS1 na fase febril pode exceder 90%, e a antigenemia pode persistir por vários dias após a resolução da febre (CHATERJI et al., 2011; DUSSART et al., 2008).

A sensibilidade da detecção de NS1 na fase febril é menor em infecções secundárias (60 a 80%), refletindo uma resposta sorológica anamnésica devido a exposição anterior ao vírus da dengue ou a outros flavivírus (GUZMAN et al., 2010).

O diagnóstico sorológico de dengue pode ser confundido se o paciente foi recentemente infectado ou vacinado com um flavivírus antígenicamente relacionado (por exemplo, um vírus associado à febre amarela ou encefalite japonesa). Além disso, os pacientes com infecções secundárias apresentam respostas rápidas de anticorpos anamnésicos, nas quais a IgG reativa ao vírus da dengue pode predominar sobre a IgM. Em ambientes clínicos onde os métodos de detecção molecular (por exemplo, RT-PCR) não estão disponíveis, a investigação de níveis elevados de IgM reativa ao vírus da dengue ou NS1 solúvel no soro é uma abordagem diagnóstica pragmática em um paciente suspeito de dengue (GUZMAN et al., 2010; FRY et al., 2011).

A escolha do método de diagnóstico depende da finalidade para a qual o teste é feito (por exemplo, diagnóstico clínico, inquérito epidemiológico, desenvolvimento de vacinas), o tipo de instalações laboratoriais e conhecimentos técnicos disponíveis, custos e o tempo de coleta da amostra. Em geral, os testes com alta sensibilidade e especificidade requerem tecnologias mais complexas e conhecimento técnico, enquanto os testes rápidos podem comprometer a sensibilidade e especificidade para a facilidade de desempenho e velocidade na obtenção do resultado. Isolamento de vírus e detecção de ácido nucleico são mais trabalhosos e caros, mas também são

mais específicos do que a detecção de anticorpos usando métodos sorológicos, levando em consideração a reatividade cruzada em áreas endêmicas. A Figura 17 mostra uma relação inversa geral entre a facilidade de uso ou acessibilidade de um método de diagnóstico e a confiança nos resultados do teste (WHO, 2009).

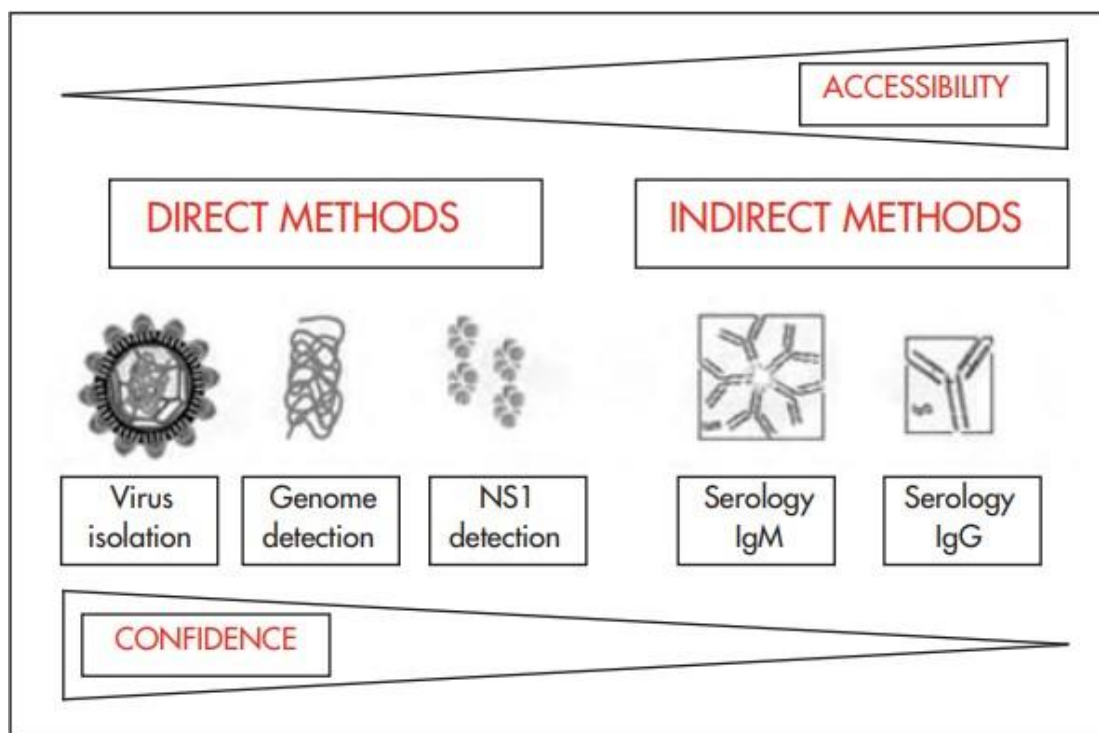


Figura 17- Comparação dos testes diagnósticos de acordo com sua acessibilidade e confiabilidade. Os métodos indiretos apesar de mais baratos, acessíveis e de fácil execução são mais associados a erros de diagnóstico em áreas endêmicas. Já os métodos diretos, apesar de mais caros e de exigirem profissionais mais capacitados, apresentam maior confiabilidade nessas regiões, evitando resultados falso-positivos. **Fonte-** WHO, 2009.

Ao final do ano de 2015, a primeira vacina para a dengue, a Dengvaxia (CYD-TDV), produzida pela empresa *Sanofi Pasteur* foi licenciada para uso em humanos em vários países, em indivíduos de 9 a 45 anos que vivem em áreas endêmicas. Entretanto, dados recentes da população vacinada em cinco países da América Latina demonstram que a proteção conferida pela vacina foi baixa e variável entre os sorotipos virais (\approx 50,3% de proteção para o DENV-1, 42,3% para o DENV-2, 74% para o DENV-3 e 77,7% para o DENV-4) e isso foi diretamente correlacionado com o status imune dos indivíduos. (VILLAR et al., 2015). O Departamento de Saúde das Filipinas decidiu então suspender o registro da vacina contra a dengue após a divulgação destes estudos.

Corroborando estes achados, informações preliminares recentes apontaram o desenvolvimento de manifestações mais graves da doença em indivíduos soronegativos vacinados, e desde novembro de 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) passou a recomendar que a vacina não seja administrada em indivíduos nunca expostos ao DENV (ANVISA, 2018).

Venturosamente, o Instituto Butantan em parceria com o National Institute of Health (NIH) está desenvolvendo uma vacina de dose única contra os quatro sorotipos do DENV. Neste momento o estudo encontra-se na fase III, com a vacinação de 17 mil voluntários. Após esse processo, a vacina será submetida à aprovação da Anvisa, para que posteriormente possa ser disponibilizada para a população na rede pública de saúde. Os dados disponíveis até o momento indicam que a vacina é segura, que induz o organismo a produzir anticorpos de maneira equilibrada contra os quatro sorotipos do DENV e que é potencialmente eficaz.

Além disso, um teste de três anos envolvendo a liberação de mosquitos *Aedes aegypti* infectados com *Wolbachia*, na cidade Yogyakarta, Indonésia, produziu resultados encorajadores que mostram uma redução significativa no número de casos de dengue. As *Wolbachia* são bactérias simbióticas naturais intracelulares em insetos, conhecidas por reduzir a capacidade do mosquito de transmitir o vírus da dengue e vírus relacionados em condições de laboratório. O estudo constatou que na cidade e arredores onde os mosquitos infectados foram liberados, o número de casos da doença diminuiu significativamente em comparação com partes da cidade onde eles não foram liberados (OMS, 2020).

No Brasil, três cidades foram selecionadas para realizar a etapa final do método “Wolbachia” para o combate ao mosquito *Aedes aegypti*, antes da sua incorporação ao Sistema Único de Saúde (SUS). A nova fase do projeto World Mosquito Program Brasil (WMPBrasil) da Fiocruz em parceria com o Ministério da Saúde será testada nos municípios de Campo Grande (MS), Belo Horizonte (MG) e Petrolina (PE). A metodologia é inovadora, autossustentável e complementar às demais ações de combate ao mosquito vetor (FIOCRUZ, 2020).

Até o momento, não há tratamento antiviral específico para a dengue. A terapia utilizada é de suporte sintomático, hidratação e repouso. Considerando a prevalência e co-circulação dos vários sorotipos do agente etiológico em todo o território nacional, o desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas deve considerar seu

contexto de aplicação, e sua efetividade mesmo em casos graves da doença, como ocorre em infecções secundárias heterólogas.

Dessa forma, a busca por terapias sejam elas focadas no patógeno (antivirais) e/ou hospedeiro (anti-doença) é essencial. Para a proteção individual, é recomendado o uso de repelentes e também a utilização de roupas que minimizem a exposição da pele aos vetores diurnos. Já para o controle de vetores, é importante combater os focos de acúmulo de água em diversos recipientes (latas, copos plásticos, pneus velhos, vasos de plantas, garrafas, caixas d'água e lixeiras), os quais são locais propícios para a criação do mosquito transmissor (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015).

1.6 Antivirais

A emergência e reemergência de doenças virais têm aumentado a preocupação acerca de seu impacto na saúde pública global e nos sistemas socioeconômicos (WEAVER *et al.*, 2018). Com isso a necessidade da descoberta e aprovação de medicamentos antivirais para o controle dessas doenças tem se tornado cada vez mais evidente com o crescente número de infecções ao longo dos últimos anos (DONG & DIMOPOULOS, 2021).

O desenvolvimento de medicamentos antivirais traz consigo diversos desafios, como a grande variabilidade dos vírus e seus diferentes mecanismos de replicação, o período de latência em alguns casos, a dificuldade de um diagnóstico preciso, já que a infecção por diferentes vírus pode causar sintomas parecidos, etc (VILAS BOAS *et al.*, 2019). Diferente dos procariontes e eucariontes, os vírus possuem genoma de fita-dupla ou simples, RNA ou DNA, alguns apresentam envelope, outros não, etc. Todas essas características são importantes no desenvolvimento de drogas antivirais, que geralmente focam na desestabilização de um dos componentes virais (MULLER *et al.*, 2009).

As moléculas antivirais de primeira geração (descritas nos anos 60 e no início dos anos 70) tiveram efeitos colaterais graves em humanos devido à sua baixa especificidade. Por exemplo, a vidarabina, um análogo da adenosina usado como inibidor da replicação, pode afetar não apenas a DNA polimerase viral, mas também o análogo eucariótico (THOMPSON & WHITLEY, 2011). O avanço das pesquisas na área levou à descrição de moléculas melhores, como o aciclovir, primeiro análogo de nucleotídeo e antiviral considerado bem-sucedido no tratamento das infecções pelos

vírus herpes simplex (HSV) e varicela zoster (VZV). Por causa de sua especificidade esta molécula causa menor toxicidade para o hospedeiro quando comparada aos tratamentos usados anteriormente (THOMPSON & WHITLEY, 2011; ELION, 1982).

As drogas antivirais podem inibir a RNA polimerase (NS5 por exemplo), impedindo que haja a replicação viral, o que fazem os análogos de nucleotídeos, podem atuar modulando a resposta do hospedeiro estimulando a produção de IFNs ou ainda atuar causando danos a estruturas da partícula viral (envelope e membrana por exemplo), impedindo que ocorra sua adsorção à célula hospedeira (LO & PERNG, 2016). Existem também os antivirais direcionados ao hospedeiro, que se concentram em- ciclofilinas de inibição, conhecidas por serem importantes fatores celulares que são sequestrados por alguns vírus durante o ciclo de replicação (LOU Z, SUN & RAO Z, 2014); o uso de imunomoduladores como interferons (EL RAZIKY et al., 2013; FCHING LIN, YOUNG HA, 2014); e gamaglobulinas (BUTTINELLI et al., 2003).

A justificativa para os antivirais para dengue surgiu de estudos clínicos que observaram que a quantidade de vírus circulando no sangue de pacientes que desenvolvem dengue grave é maior em cerca de 1–2 logs em comparação com pacientes que sofrem de dengue mais branda. Diferenças semelhantes na carga viral foram observadas em modelos animais de ADE (GONCALVEZ et al., 2007; BALSITIS & HARRIS, 2009). Esta observação sustenta a hipótese de que o progresso para a doença grave pode ser revertido pela administração de compostos que visam etapas essenciais na replicação do vírus no início da doença, reduzindo assim a carga viral substancialmente.

Nos últimos anos, o rápido desenvolvimento de métodos de triagem de alto rendimento levou à descoberta de uma infinidade de compostos que podem inibir a infecção por arbovírus e / ou sua replicação em células de vertebrados (KATO et al., 2019; EYRE et al., 2020), sendo que alguns também provaram ser eficaz nas células do mosquito. Através da triagem de moléculas *in vitro*, centenas de drogas que podem inibir pelo menos um tipo de arbovírus em células de mamíferos foram identificadas (KATO et al., 2019; VAN CLEEF et al., 2013). Drogas provenientes de moléculas pequenas, com baixo peso molecular (geralmente abaixo de 900 Daltons) podem atuar regulando processos bioquímicos específicos resultando no tratamento ou prevenção de doenças. Além disso, são facilmente sintetizadas devido ao seu peso molecular relativamente baixo e estrutura química simples, e geralmente são

altamente estáveis (SAMANEN, 2013).

Em contrapartida, a baixa eficácia dos tratamentos antivirais ainda é evidenciada pelos relatórios cada vez maiores de resistência viral (DURAFFOUR et al., 2012; LE PAGE et al., 2013; MUSIIME et al., 2013), infecções virais concomitantes (DEMING & MCNICHOLL, 2011) e a emergência e reemergência de epidemias virais em períodos relativamente curtos de tempo, como observado para o H1N1, vírus Ebola e ZIKV apenas nos primeiros 5 anos da presente década (HUI, LEE & CHAN, 2017; MARSTON et al., 2017; SUIJKERBUIJK et al., 2014; DE SOUZA et al., 2018; LOWE et al., 2018), e agora para o Sars-Cov-2.

Uma alternativa ao desenvolvimento de um fármaco específico para o tratamento da dengue tem sido o reposicionamento de drogas já aprovadas para o tratamento de outras doenças (LOW, GATSINGA, VASUDEVAN & SAMPATH, 2018). Neste sentido, diversos estudos vêm sendo conduzidos a fim de identificar fármacos com diversos mecanismos de ação para o manejo clínico da dengue, dentre os quais estão drogas antivirais, antimaláricas, antidiabéticas, anti-histamínicas, antipsicóticas, antiparasitárias, anticâncer, entre outras (RADI et al., 2018). Na Figura 18 a seguir estão demonstrados os diversos alvos destas drogas no ciclo de multiplicação do DENV.

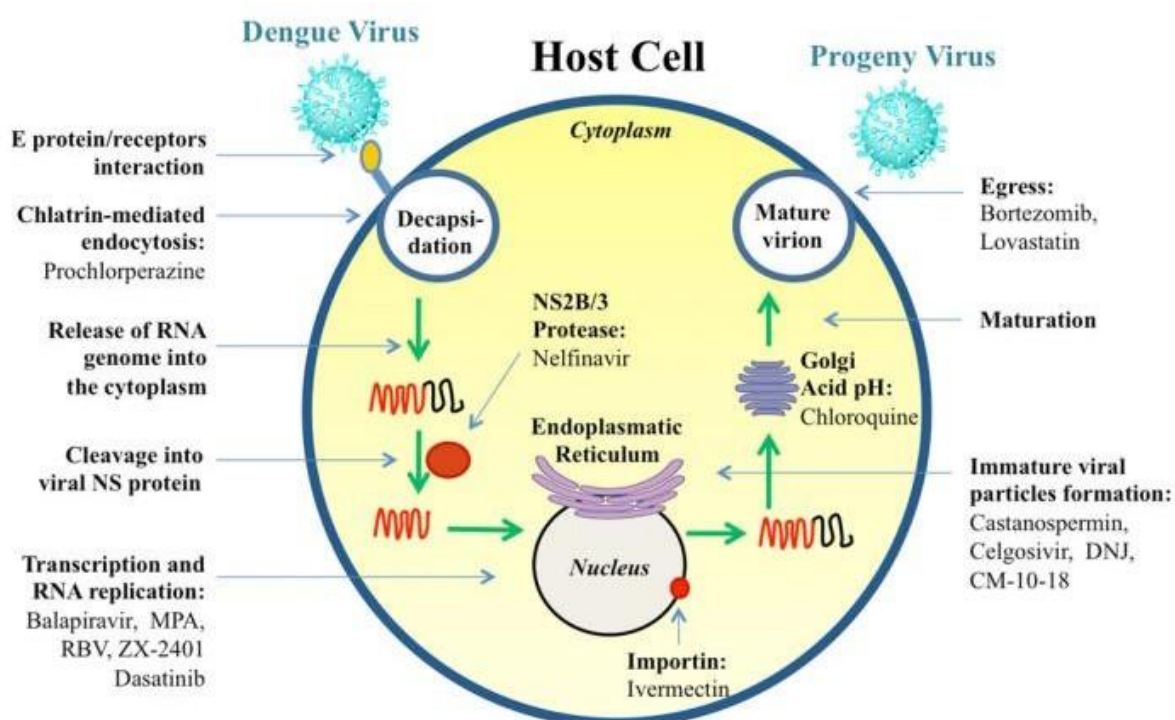


Figura 18- Ciclo de multiplicação do DENV e etapas inibidas por medicamentos reposicionados.

Drogas com um mecanismo de ação descrito foram colocados nos seus locais de inibição da seguinte forma- inibição do vírion; adsorção; penetração viral; escape endossomal; remoção viral; replicação do genoma viral e, liberação de vírions maduros. **Fonte-** Radi et al., 2018.

Embora a cloroquina tenha apresentado evidências de atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* (FARIAS et al., 2015) não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com a droga ou o placebo, sendo que o grupo tratado com a cloroquina apresentou diversos eventos adversos (TRICOU et al., 2010). Um estudo clínico randomizado realizado no Vietnã não identificou benefícios na administração de prednisolona a pacientes com dengue grave (TAM et al., 2012). Também no Vietnã, a droga balapiravir foi administrada em um estudo para avaliar sua ação anti-dengue e diferenças entre os grupos controle e tratado não foram observadas (CHEN et al., 2014; NGUYEN et al., 2013). Além disso, a administração de lovastatina se mostrou segura em pacientes com dengue, porém sem evidências de efeitos benéficos em termos de progresso clínico ou redução da viremia (WHITEHORN et al., 2016).

Um ensaio clínico (NCT026773840) conduzido por Duke-NUS, em parceria com o Hospital Geral de Cingapura e o Hospital Universitário Nacional em Cingapura está avaliando a segurança clínica e eficácia do fármaco cetotifeno, com capacidade de regular a degranulação dos mastócitos, importante na patogênese da dengue (FURUTA et al., 2012). Também estão em curso estudos direcionados a administração dos fármacos ribavirin (LOW et al., 2018) e celgosivir (LOW et al., 2014) na infecção pelo vírus da dengue. Embora os estudos clínicos ainda não tenham atingido o objetivo de disponibilizar um medicamento para o tratamento de pacientes com dengue, têm reforçado a compreensão de sua patogênese e preparado o terreno para projetos futuros (LOW et al., 2018).

Com a emergência de infecções virais, a demanda para produção de novos antivirais é maior do que nunca, com maior preferência por moléculas capazes de apresentar atividade de amplo espectro (DA ZHUJ et al., 2015). A busca por essas novas moléculas envolve diferentes abordagens, como previsões assistidas por bioinformática com base na interação da molécula com importantes estruturas virais ou enzimas (WANG et al., 2010; JESUS et al., 2012; ELSHABRAWY et al., 2014) e o isolamento de novos compostos obtidos de fontes naturais (MARTINS et al., 2009; CANTATORE et al., 2013; ROTHAN et al., 2014).

1.7 Peptídeo antiviral AH-D

Uma medida terapêutica de sucesso para infecções virais precisa ter como alvo direto as partículas virais circulantes a fim de reduzir as cargas virais sistêmicas e diminuir sua propagação (JACKMAN, J.A., COSTA, V.V., PARK, S. *et al.* 2018). Entretanto, a busca por antivirais que possam ser aplicados ao tratamento das infecções virais transmitidas por mosquitos enfrenta diversos obstáculos- i) Grande parte dessas infecções são agudas, com uma janela terapêutica curta (SIMMONS *et al.*, 2012); ii) A maioria dos indivíduos infectados são assintomáticos, porém quando há o aparecimento de sintomas a carga viral já está em declínio (VAUGHN *et al.*, 2000); iii) para aplicação terapêutica em arboviroses, a estratégia ideal seria um antiviral com amplo espectro para diversos vírus relacionados, como DENV, ZIKV, YFV, e CHIKV, que co-circulam em diversas regiões tropicais e subtropicais e levam a manifestações clínicas similares, então a aplicação de um antiviral específico exigiria diagnóstico confirmatório, o que encurtaria ainda mais a janela terapêutica (CARRILLO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018); iv) muitos vírus transmitidos por mosquitos são neurotrópicos e causam distúrbios neurológicos trazendo a necessidade de um inibidor capaz de cruzar a barreira hematoencefálica e suprimir de forma eficiente a replicação do vírus no cérebro (SHAN *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016).

Há muito se sabe que os vírus transmitidos por mosquitos possuem um revestimento do envelope lipídico, que é essencial para a sua integridade estrutural (WELSCH, MÜLLER & KRAUSSLICH, 2007). Badani e colaboradores (2014) verificaram que a desestabilização do revestimento do envelope lipídico reduz a infectividade viral *in vitro*, conceito que poderia ser aplicado no desenvolvimento de drogas antivirais com alvo na partícula viral sem por sua vez, causar danos ao organismo do hospedeiro. Neste sentido uma série de grupos mostraram que desestabilizar o envelope lipídico provocando alterações na morfologia dos vírions ou na fluidez da membrana viral impedem a fusão vírus-célula, reduzindo a infectividade viral *in vitro*, e uma ampla gama de compostos com essas propriedades foi desenvolvida, porém sem especificidade adequada, provocando lesões às membranas celulares (BADANI *et al.*, 2014; VIGANT, SANTOS & LEE, 2015).

Diante da carência de uma droga capaz de desestabilizar o envelope viral cuja administração não causasse danos ao indivíduo submetido ao tratamento, Cho e

colaboradores (2009) se basearam em estudos anteriores envolvendo vírus com genoma de RNA de senso positivo para o desenvolvimento de uma terapia que pudesse ser aplicada a uma ampla gama de infecções virais com alta seletividade pela partícula viral. Essa busca levou ao segmento anfipático helicoidal da porção N-terminal da proteína não estrutural 5A (NS5A) do vírus da hepatite C (HCV), responsável por sua interação com estruturas da membrana da célula hospedeira por sua forte associação com membranas anteriormente descrita. Esta hélice anfipática (AH) é necessária e suficiente para conferir associação de membrana e mutações genéticas que introduzem aminoácidos em sua face hidrofóbica atrapalham sua natureza anfipática e inibem sua associação a membranas (BRASS, 2002; ELAZAR, 2003; HIJIKATA, 1993; SELBY, 1993).

Ao aprofundar os estudos acerca do segmento AH, Cho (2009) e colaboradores projetaram o peptídeo anfipático α -helicoidal (AH-L), derivado dos primeiros 27 aminoácidos da proteína NS5A do HCV e observaram a transformação estrutural de vesículas lipídicas com a introdução de sua formulação sintética. Seu estudo demonstrou que a interação entre o peptídeo AH-L e vesículas lipídicas intactas, resulta em mudanças estruturais nessas vesículas, que apresentam uma espécie de inchaço. Mais tarde, Jackman (2015) e colaboradores demonstraram que o peptídeo AH-L é altamente ativo em membranas e rompe vesículas, como demonstrado na Figura 19, além de possuir alta seletividade por seu tamanho, suportando a ideia de que este poderia ser um modelo promissor para agentes antivirais de próxima geração.

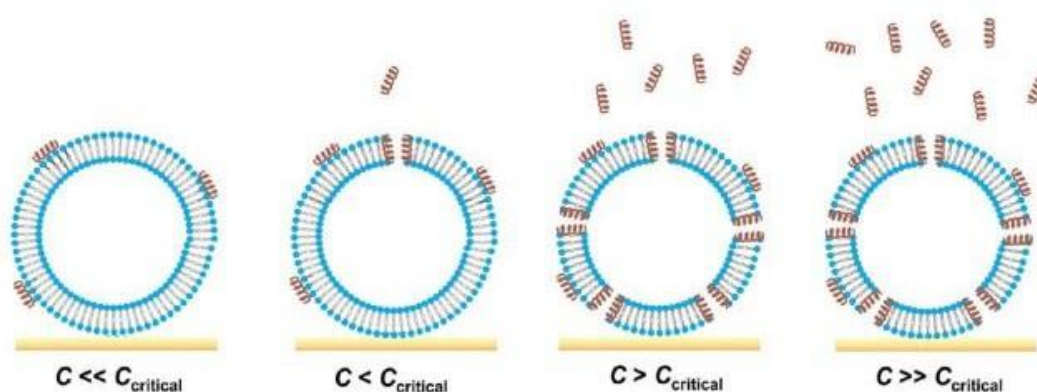


Figura 19- Ilustração esquemática do modelo de formação de poros induzida pelo peptídeo AH. Lise da membrana ocorre uma vez que uma densidade superficial crítica de poros é formada em uma vesícula. O termo c representa a concentração em massa do peptídeo, e $c_{critical}$ descreve o limite de

concentração de peptídeo em massa ou acima do qual a lise de membrana mediada por poros pode ocorrer. Fonte- Yoon et al., 2020.

Inicialmente, a eficácia do peptídeo foi avaliada no rompimento de lipossomas, semelhantes ao envelope lipídico dos *Flavivirus*. Posteriormente foi avaliada sua afinidade por vesículas lipídicas de diferentes tamanhos e observou-se que o peptídeo interage preferencialmente com lipossomas com tamanho aproximado de ~ 50-100 nm de diâmetro (CHO et al., 2011).

Por meio de refinamentos dos parâmetros estruturais do peptídeo foram alcançadas melhorias em suas propriedades terapêuticas e com a utilização de técnicas de bioengenharia foi desenvolvida então a estratégia terapêutica chamada LEAD (lipid envelope antiviral disruption, ou ruptura antiviral do envelope lipídico) (JACKMAN, SHI & CHO, 2018). A fim de melhorar as propriedades farmacológicas do peptídeo, Jackman e colaboradores projetaram um análogo substituindo L-aminoácidos convencionais por D-aminoácidos que são mais resistentes à degradação proteolítica (HANCOCK & SAHL, 2006), dando origem ao peptídeo AH-D, o que permitiu um perfil farmacocinético melhorado, com uma circulação relativamente longa, alta biodisponibilidade e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica.

Ao avaliar-se a atividade do peptídeo contra o ZIKV (que possui ~50 nm de diâmetro) em culturas de células neuronais primárias foi demonstrado que o tratamento foi capaz de inibir a replicação viral e evitou a morte celular neuronal induzida pelo ZIKV, sem apresentar toxicidade nas concentrações inibitórias. Em seguida, foi demonstrado o papel terapêutico do tratamento com o peptídeo sintético AH-D, em camundongos infectados pelo ZIKV. Os resultados demonstraram que a administração do AH-D a partir do segundo dia de infecção, promoveu a redução significativa de sinais clínicos e da mortalidade causados por este patógeno, estando associado ainda, com neuroproteção demonstrada pela redução da neuroinflamação e lesão no sistema nervoso destes animais (JACKMAN, COSTA, PARK et al., 2018).

Além disso, o peptídeo foi altamente ativo contra outros vírus transmitidos por mosquitos *in vitro*, incluindo o vírus da dengue, Encefalite Japonesa e da Chikungunya. Logo, nossa proposta foi testar o potencial terapêutico do peptídeo AH-D frente à infecção pelo DENV em um modelo de viremia em camundongos A129. A infecção destes camundongos pelo DENV reproduz várias características da doença

clínica vista em seres humanos, incluindo plaquetopenia, níveis elevados de marcadores inflamatórios, aumento da permeabilidade vascular, lesão hepática, carga viral elevada em diversos órgãos como o baço, o fígado e o plasma (FAGUNDES et al., 2011; ROTHMAN et al., 2011; ZOMPI et al., 2012; COSTA et al., 2013).

1.8 Modelos experimentais aplicados ao estudo da infecção pelo DENV

A utilização de animais para fins científicos tem contribuído significativamente para a descoberta de fármacos e vacinas principalmente. Estes testes precedem os ensaios clínicos em humanos e permitem que as próximas etapas (FASE I, II e III) sejam realizadas de forma segura. Apesar das dificuldades de se desenvolver um modelo experimental em animais que mimetize as formas graves da doença em humanos, diversos modelos já foram descritos, tornando acessível o entendimento da imunopatogênese da infecção pelo DENV bem como o teste de medicamentos antivirais e vacinas. Na tabela 1 a seguir, estão listados alguns modelos, com sua aplicabilidade, vantagens e desvantagens (FAGUNDES et al., 2011; ROTHMAN et al., 2011; ZOMPI et al., 2012; COSTA et al., 2013).

Modelos experimentais murinos usados para estudos pré-clínicos da infecção pelo DENV-

Camundongo	Características	Vantagens	Desvantagens	Aplicabilidade
NSG (NOD SCID GAMMA)	Camundongos reconstituídos com células progenitoras humanas, infectados com isolados clínicos do DENV.	Camundongos desenvolvem sistema imune humano funcional e parte da imunidade adaptativa; infecção de linhagens celulares humanas; estudo da resposta humana à infecção.	Não desenvolvem a forma mais grave da doença.	Estudo da patogênese da dengue; tropismo do vírus por célula humana; estudos da aplicação de vacinas que utilizam vírus atenuado in vivo.

IFN α / β -/ (IMUNODEF ICIENTES)	Camundongos infectados com isolados clínicos do DENV; alta viremia.	Suporta replicação relevante de isolados clínicos do DENV; camundongos desenvolvem marcadores de viremia; modelo ADE.	Ausência de componentes críticos do sistema antiviral do hospedeiro; inadequado para avaliação da resposta imune à infecção e da patogênese da doença grave; ocorrência de paralisia e encefalite letal.	Investigar tropismo celular e tissular do DENV; triagem de drogas antivirais.
---	---	---	--	---

BALB/C e C57BL/6 (IMUNOCO M PETENTES)	Camundongos com sistema imune intacto infectados com isolados do DENV adaptado.	Camundongos desenvolvem mais manifestações clínicas observadas em humanos com Dengue com sinais de alarme.	Adaptação do vírus por múltiplas passagens em camundongos; pode envolver mecanismos patológicos diferentes do vírus original em humanos; doença grave ocorre em infecção primária.	Estudo da patogênese da dengue com sinais de alarme; tropismo celular do vírus; resposta imune e inflamatória do hospedeiro à infecção.
---	---	--	--	---

Tabela 1- Modelos experimentais murinos usados para estudos pré-clínicos da infecção pelo DENV. Fonte- Fagundes et al., 2011; Rothman et al., 2011; Zompi et al., 2012; Costa et al., 2013.

Camundongos com uma interrupção direcionada dos genes que codificam o receptor de IFNs tipo I (A129), II ou ambos (AG129) são extremamente suscetíveis a infecções virais. Esses camundongos têm vários defeitos na montagem da resposta imune do hospedeiro e apresentam replicação viral aumentada ou exacerbada em muitos tecidos (COSTA et al., 2013). Dessa forma a utilização destes camundongos contribui para o estudo de diversos parâmetros da infecção pelo vírus da dengue bem como sua interação com o hospedeiro, além de permitir a investigação do tropismo celular e tissular do DENV e a triagem de potenciais drogas antivirais.

II. JUSTIFICATIVA

A dengue é a arbovirose mais relevante no globo. Estima-se que 390 milhões de infecções ocorram por ano no mundo, onde 2 milhões de indivíduos evoluem para os quadros graves da doença e destas, mais de 20 mil evoluem para óbito. Os dados epidemiológicos da infecção pelo DENV no Brasil são alarmantes. No período entre 2008 e 2019 foram notificados no Brasil 11,6 milhões de casos da doença. Até a SE 47 do ano de 2021, foram notificados 498.478 casos prováveis (taxa de incidência de 233,7 casos por 100 mil habitantes) de dengue no país.

Apesar de nas últimas décadas ter havido um grande volume de trabalhos focados na identificação de drogas voltadas para o tratamento de pacientes com dengue, seja envolvendo compostos novos ou o reposicionamento de fármacos já aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para outras condições patológicas, ainda não há evidências a favor do uso de nenhum agente terapêutico exclusivo para dengue. Trata-se de uma patologia responsável por um grande número de hospitalizações, com crescente taxa de morbimortalidade, representando um importante problema de saúde pública mundial. Diante disso, a busca por estratégias terapêuticas deve se estender até a identificação de um esquema de tratamento satisfatório, capaz de reduzir o número de hospitalizações e óbitos provocados pela doença.

O peptídeo AH-D apresentou atividade antiviral de amplo espectro (*in vitro*), essencial ao tratamento de arboviroses em áreas endêmicas, baixa toxicidade nas concentrações inibitórias e possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, eficaz nos casos onde houver o acometimento do sistema nervoso central em decorrência da infecção, comum a diversos vírus transmitidos por mosquitos, o que o torna um antiviral promissor para o tratamento das arboviroses. Além disso, o tratamento de camundongos infectados pelo vírus da zika com o peptídeo AH-D se mostrou eficaz na redução da carga viral e dos danos decorrentes da infecção. Diante disso, a avaliação de sua eficácia terapêutica em um modelo de infecção pelo vírus da dengue *in vivo* é fundamental pois precede os testes clínicos em humanos, podendo contribuir para o avanço no manejo clínico da doença, o que justifica o presente trabalho.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antiviral do peptídeo AH-D na infecção pelo vírus da dengue.

3.2 Objetivos específicos

- I. Caracterizar o efeito anti-DENV do peptídeo AH-D in vitro.
 - a. Avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo AH-D na viabilidade celular de células Vero CCL-81.
 - b. Avaliar o efeito antiviral do tratamento com o peptídeo AH-D em células Vero CCL-81 infectadas pelo DENV.
- II. Implementar um modelo de infecção pelo DENV-3 em camundongos da linhagem A129 e avaliar o potencial antiviral do peptídeo AH-D neste modelo.
 - a. Caracterizar o melhor inóculo viral através da avaliação da morbimortalidade após a infecção.
 - b. Avaliar os parâmetros clínicos de doença, a produção de mediadores inflamatórios e o recrutamento celular, além da lesão e tropismo viral nos camundongos A129 inoculados com o melhor inóculo definido no item IIa.
- III. Avaliar o potencial antiviral e terapêutico do peptídeo AH-D no modelo de infecção proposto. Para isso, dois esquemas de tratamento com o peptídeo AH-D foram realizados, a saber- profilático e terapêutico, assim como descrito na metodologia. Todas as análises descritas nos itens IIa e IIb foram realizadas.

IV. METODOLOGIA



Figura 20- Fluxograma de trabalho para o desenvolvimento do projeto. O organograma acima demonstra de maneira resumida as etapas de desenvolvimento do projeto proposto, tendo início com a caracterização do papel antiviral do peptídeo AH-D *in vitro*, seguida pela caracterização do modelo de infecção *in vivo* que incluiu a definição do melhor inóculo do DENV para os experimentos e posterior caracterização dos parâmetros clínicos desenvolvidos no modelo, bem como posterior avaliação do impacto do tratamento com o peptídeo AH-D nos camundongos A129 infectados pelo DENV-3.

4.1 Ensaio de morte celular (LDH)

Para realização da dosagem de Desidrogenase láctica (LDH) no sobrenadante das culturas de células foi utilizado kit de reagentes Bioclin (K014-2). Para tanto, ao final do experimento *in vitro* (48 horas após a infecção) uma alíquota de 4µL do sobrenadante foi transferida para uma nova placa de 96 poços e então adicionado 200µL do reagente conforme especificação do fabricante (solução de substrato tamponado e coenzima na proporção 1-5). Em seguida foram realizadas quatro leituras (sendo a 1ª imediatamente após a adição do reagente as leituras seguintes nos tempos de 1, 2 e 3 minutos após a 1ª leitura) da absorbância no comprimento de onda de 340 nm em leitor de microplacas com temperatura de 37°C. Os resultados foram calculados multiplicando a média das absorbâncias por minuto ($\Delta A/\text{min}$) pelo fator de correção especificado no datasheet do kit. Os resultados foram expressos em

U/L.

4.2 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Para realização do ensaio de viabilidade celular foi utilizado o ensaio de MTT, baseado na conversão do composto solúvel em água em um produto de formazano insolúvel. Para tanto, ao final do experimento *in vitro* (48 horas após a infecção) o sobrenadante dos poços foi descartado (preservando a monocamada de células) e então foram adicionados 90µL de meio de cultura (RPMI sem soro fetal bovino) aos poços. Em seguida foram adicionados 10µL de solução de MTT (na concentração de 5mg/ML de salina, atingindo a concentração final de 0,5µg/mL por poço). A placa foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 90 minutos ao abrigo da luz. Após esse período o sobrenadante foi novamente descartado (preservando a monocamada de células) e foram adicionados 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) aos poços. Em seguida, a placa foi mantida em agitação por 15 minutos a temperatura ambiente. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 490 nm em leitor de microplacas. O percentual da viabilidade celular foi calculado comparando as absorbâncias dos poços tratados e infectados com os poços controle.

4.3 Animais/ infecção

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos e fêmeas, com seis a oito semanas de vida (camundongos adultos jovens) deficientes para o gene que codifica o receptor dos Interferons Tipo-I IFN α/β (A129), obtidos originalmente do Biotério de Matrizes da Universidade de São Paulo (USP), criados e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB da UFMG, em Belo Horizonte, Minas Gerais, sob condições controladas de temperatura (28°C a 30°C), umidade (50%), ventilação, ciclos de iluminação de 12 horas e ração e água sem restrições. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG, sob o protocolo 234/2019 (Anexo I).

A implementação do modelo envolveu os seguintes parâmetros- avaliação dos sinais clínicos e letalidade, recuperação da carga viral viável e análise do processo inflamatório decorrente da infecção. A partir dos resultados deste experimento foi

definido o inóculo 100% letal com melhor janela terapêutica, o qual foi utilizado nos experimentos subsequentes. Para tanto, os camundongos receberam quatro inóculos diferentes (2×10^2 a 2×10^5 PFU/camundongo, baseado na literatura) do DENV. As análises envolveram os seguintes parâmetros- morbidade (perda de massa corporal) e letalidade (considerada nos animais com perda igual ou superior a 20% da massa inicial), respectivamente. A avaliação de perda de massa corporal consistiu no acompanhamento de cada animal, pesado individualmente em balança semi-analítica do dia anterior a infecção até o dia em que a perda de massa corporal foi igual ou superior a 20% da massa inicial, onde o animal foi eutanasiado.

4.4 Vírus

Neste trabalho foram utilizadas a linhagem do DENV-3 (Strain 91 15 AM BR 2015), gentilmente cedida pelo Prof. Mauricio Lacerda Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP e DENV-2 (Strain 3295- Genbank EU081177.1) doada pelo Prof. Eng Eong Ooi da DUKE Medical School of Singapore – DUKE NUS.

O DENV foi propagado em células C6/36 (*Aedes albopictus* clone C6/36) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) sob número 0343 mantidas em estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), com atmosfera umidificada a 37°C na presença de meio de cultivo Leibowitz L.15 suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 10% Soro Fetal Bovino – por 5-7 dias.

Os sobrenadantes obtidos das culturas infectadas foram centrifugados a 600g por 10min para retirada dos fragmentos celulares. Subsequentemente, o sobrenadante foi adicionado a coluna de concentração viral (Vivacell 100 centrifugal concentrator – Sartorius, Alemanha) e as partículas virais foram concentradas pelo auxílio de centrifugação (2000g por 10 min). O volume que ultrapassou a membrana foi descartado e o sobrenadante que permaneceu no concentrador foi aliquotado e armazenado em freezer -80°C. O título viral, expresso em unidades formadoras de placa (PFU)/mL, das amostras foi obtido através do ensaio de formação de placas em células permissivas da linhagem VERO, como descrito no item a seguir.

4.5 Determinação da carga viral

Para determinar a carga viral nos estoques virais e amostras de soro e tecidos dos camundongos infectados pelo DENV, foram empregadas as técnicas de titulação pelo ensaio de formação de placas de lise e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR).

Células da linhagem VERO CCL-81 (células derivadas de rim do macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*) também provenientes do BCRJ sob número 0245 foram crescidas em meio RPMI 1X, suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 10% Soro Fetal Bovino. As células serão tripsinizadas, homogeneizadas e implantadas em placas de 6 ou 21 poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço e 5×10^5 células/poço, respectivamente. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por cerca de 24 horas, quando seus poços apresentaram uma monocamada de células com uma confluência de 85 a 90%.

Os estoques virais e as amostras de plasma obtidas dos camundongos infectados foram diluídos serialmente em meio RPMI. As amostras de baço, fígado, e cérebro foram pesadas, maceradas com cadinho e pistilo de porcelana estéreis e diluídas serialmente, seguindo a proporção de 10% peso/volume, em meio RPMI com antibióticos na ausência de SFB. A cada poço de uma placa foi adicionado 400µL (para placa de 6 poços) ou 300µL (para placa de 12 poços) de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-5}) de uma dada amostra (tecido) ou diluições de (10^{-2} a 10^{-4}) para o plasma. O controle de células foi um poço não inoculado, ao qual foi acrescentado apenas o meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB nos mesmos volumes. As placas foram incubadas por um período de uma hora a 37°C (período de adsorção viral) durante o qual foram gentilmente movimentadas de quinze em quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Terminado o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com meio DMEM. Em seguida, foi adicionado meio DMEM contendo 1.6% de carboximetilcelulose, antibióticos e 2% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C por quatro dias, período no qual os efeitos citopáticos podem ser observados ao microscópio invertido. Após este período, as mesmas foram fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, coradas

com solução 1% p/v de cristal violeta em H₂O deionizada, para a determinação do título das amostras, os quais serão expressos em PFU/g ou PFU/mL (unidades formadoras de placa).

4.6 Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas

Para dosagem dos mediadores inflamatórios (TNF α , IL-10, IL-6 e IL-1 β , IFN- γ), quimiocinas (CCL2, e CCL5), fragmentos de tecido (baço, fígado, cérebro,) foram homogeneizados em solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1mM *phenylmethanesulfonyl fluoride*; 0,1mM *benzethonium chloride*; 10mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% *Tween 20*, na proporção de 0,1g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125. Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e os sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) a -20°C, para posterior análise.

As amostras de soro e tecidos foram analisadas na diluição 1-3 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina, como previamente padronizado em nosso laboratório. Foram utilizados kits de anticorpos (R&D Systems, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Para a realização do ensaio, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4), sendo que a sensibilização ocorrerá durante 18h a 4°C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma.Aldrich, 25 EUA). As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços e incubados por 18h. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (HRP.Streptavidin Pharmingem – 1-4000) e revelada com OPD (o.phenylenediamine dihydrochloride – Sigma.Aldrich, EUA). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status.labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 492nm. Os ensaios apresentam uma sensibilidade de 8.16pg/ml.

4.7 Detecção indireta do acúmulo de neutrófilos (mpo) nos tecidos

O acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi avaliado pelo ensaio indireto da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para tanto, fragmentos do baço, fígado cérebro, pata e quadríceps dos animais infectados ou controles foram retirados e congelados a -20 °C. Após o descongelamento, 100mg do tecido foi homogeneizado em 2mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO₄; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125. – Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 3000g, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelada (para 100mg de tecido, 1,5mL de solução) seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em tampão Na₃PO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% p/v e re-homogeneizado. Alíquotas de 1mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm e os sobrenadantes coletados. As amostras dos tecidos foram diluídas previamente à análise em tampão Na₃PO₄ 0,05 M na razão 1-10 (esta diluição pode variar dependendo do tecido avaliado).

A atividade da mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450nm) usando *tetramethylbenzidine* (1.6mM) e H₂O₂ (0.5mM) para a medição das alterações da densidade óptica (OD). Os resultados foram expressos como unidade relativa comparados com neutrófilos de camundongos não infectados.

4.8 Avaliação da permeabilidade vascular

A análise de extravasamento vascular *in vivo* foi realizada através de microscopia intravital. Foi administrada injeção intravenosa (100µl) de FITC. albumina (Sigma aldrich®) 5mg/ml na veia lateral da cauda dos camundongos (Rathore AP et al 2019), que após 30 minutos, foram anestesiados por via intra-peritoneal (i.p.) com uma mistura de cetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg para realização de laparotomia. Após a cirurgia os animais foram posicionados em suporte acrílico adaptado para o microscópio, com o lobo lateral esquerdo do fígado sobre a lamínula do suporte, de modo que possibilitou a captura de imagens do tecido através do

software NIS-Elements Viewer e posterior análise de extravasamento vascular, através da mensuração da fluorescência no programa de análise de imagens FIJI.

4.9 Análise hematológica

Amostras de sangue foram obtidas diretamente da veia cava dos animais, coletadas em tubos heparinizados e posteriormente separadas para contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas, hematócrito e coleta de soro. Para contagem total, amostras de sangue foram diluídas em solução de Turk a uma proporção de 1-40, contadas em câmara de Neubauer e o resultado foi expresso em número total de leucócitos/mL de sangue.

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em lâminas contendo esfregaço sanguíneo, coradas com Panótico, e o resultado expresso em número total de cada tipo celular, corrigido proporcionalmente ao resultado de contagem total da amostra.

Para a contagem de plaquetas, parte do sangue coletado foi diluído 1-100 em oxalato de amônio 1% p/v e deixado em repouso em câmara de Neubauer por no mínimo 20 min. Após a deposição das plaquetas, a contagem foi feita ao microscópio e o resultado expresso em número total de plaquetas/ μ L de sangue. Foi utilizado o microscópio Nikon XP.1000 para todos os procedimentos de contagem de leucócitos e plaquetas.

A mensuração do índice de hematócrito foi realizada utilizando capilares heparinizados para microhematócrito. Capilares contendo sangue foram centrifugados em centrífuga apropriada e o resultado expresso em porcentagem referente à fração celular do sangue. Por fim, o restante de cada amostra de sangue foi centrifugado para separação e coleta de soro (5.000 rpm por 5 minutos). Posteriormente, o soro foi dividido em dois tubos, sendo um para quantificação da carga viral (armazenado a -80°C) e o segundo para outras análises (armazenado a -20°C).

4.10 Análise histopatológica

O lobo lateral esquerdo do fígado dos animais foi coletado após a infecção e fixado em formol 1%v/v por no mínimo 2 dias e posteriormente armazenado em álcool

70% até o processamento, que consistiu em passagens em etanol com concentrações crescentes e parafina líquida. Uma vez processados, os tecidos foram incluídos em parafina, cortados, montados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para avaliação e quantificação de infiltrado inflamatório, degeneração, edema de hepatócitos e necrose como descrito por Costa e colaboradores (Costa et al., 2012). Resumidamente, foi usada uma escala de 0 a 5 pontos onde 0 corresponde à ausência de alterações teciduais, 1 corresponde à alterações mínimas, 2 à alterações leves, 3 à alterações moderadas, 4 à alterações acentuadas e 5 à alterações teciduais graves.

4.11 Atividade da função hepática

A atividade da alanina aminotransferase (ALT) foi medida em amostras individuais de soro dos camundongos A129, utilizando um kit colorimétrico disponível no mercado (Bioclin, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil). Os resultados foram expressos em U/L de plasma.

4.12 Teste de função hepática

O teste de função hepática também foi avaliado pela capacidade de depuração do Cardiogreen (Verde indocianina), uma tricarbocianina fluorescente, com ligação a proteínas perto de 95% (principalmente, alfa1. e beta.lipoproteínas e albumina). Para tanto, antes da eutanásia, foi administrado aos animais por via intravenosa, solução de ICG na concentração de 20mg/kg, sendo que o volume administrado foi ajustado de acordo com o peso de cada animal. Após 20 minutos da administração os animais foram anestesiados e eutanasiados. O sangue foi coletado e centrifugado por 10 minutos, a 7000 rpm, e o soro plaqueado em placa de 96 poços para leitura no leitor de ELISA em comprimento de onda de 800nm. A concentração de ICG no soro dos animais foi calculada através da comparação da absorbância da amostra com a absorbância da curva padrão, com concentrações entre 50µg e 0,78125µg. Em indivíduos saudáveis, o ICG mostra uma alta taxa de extração hepática, geralmente acima de 70% (Gasperi et al., 2016).

4.13 Esquemas dos protocolos experimentais

A seguir, seguem os esquemas experimentais utilizados *in vitro* e *in vivo* para

o desenvolvimento do projeto.

Estratégia experimental *in vitro*

1 Células Vero CCL-81 foram plaqueadas



2 Infecção + tratamento com AH-D após 24h do plaqueamento

3 Coleta do sobrenadante para ensaio de placa + LDH + MTT após 48h da infecção

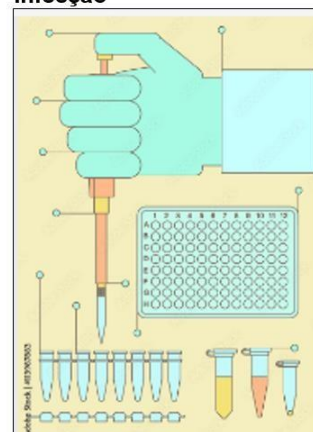


Figura 21- Estratégia experimental aplicada a caracterização do efeito anti-DENV do peptídeo AH-D *in vitro*. Células Vero CCL-81 foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo reto, próprias para cultivo celular, na concentração de 1×10^5 células por poço e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. 24 horas após o plaqueamento, as células foram incubadas com o vírus (MOI 1) na presença e ausência de diferentes concentrações do peptídeo AH-D. 1 hora após a incubação o sobrenadante foi descartado e substituído por meio de cultura com e sem diferentes concentrações do peptídeo. 24 horas após a infecção foi administrado o segundo tratamento com o peptídeo AH-D (somente poços tratados anteriormente). Após 48 horas da infecção o sobrenadante foi coletado para avaliação da carga viral por meio de ensaio de placa (titulação), avaliação de morte celular por meio de dosagem da enzima LDH no sobrenadante e avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de MTT.

Estratégia experimental *in vitro*

Desenho de placa utilizado

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		NT		AH-D [500 nm]		AH-D [100 nm]		AH-D [50 nm]		AH-D [10 nm]			
B	CONTROLE NEGATIVO	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1		
C		VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2		
D		VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3		
E													
F	CONTROLE POSITIVO (VÍRUS)	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1	VERO 1		
G		VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2	VERO 2		
H		VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3	VERO 3		

Figura 22- Desenho de placa utilizado na caracterização do efeito anti-DENV do peptídeo AH-D *in vitro*. Como demonstrado na figura acima, células Vero CCL-81 foram plaqueadas em duplicata experimental e triplicata biológica, sendo que cada fileira do “controle negativo” e do “controle positivo” correspondem a células descongeladas e mantidas em tempos distintos, porém a “Vero 1” de ambos os controles foi proveniente de uma mesma cultura. O mesmo foi feito para “Vero 2” e “Vero 3”. Nas colunas 1 e 2 as células de ambos os controles não receberam tratamento com o peptídeo AH-D. Células das colunas 3 a 10 foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações do peptídeo como descrito na figura. Nas linhas B, C e D (correspondentes ao controle negativo) as células foram incubadas com meio de cultura sem soro fetal bovino na ausência e presença de diferentes concentrações do peptídeo para avaliação do tratamento na viabilidade celular. Nas linhas F, G e H (correspondentes ao controle positivo) as células foram incubadas com o DENV diluído em meio de cultura sem soro fetal bovino, na presença e ausência de diferentes concentrações do peptídeo para avaliação da atividade antiviral do tratamento.

CEUA/UFMG Nº 234/2019

Estratégia experimental I

Definição do inóculo de infecção

Infecção intravenosa com diferentes inóculos do DENV-3

(2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 e 2×10^5 PFU/animal)

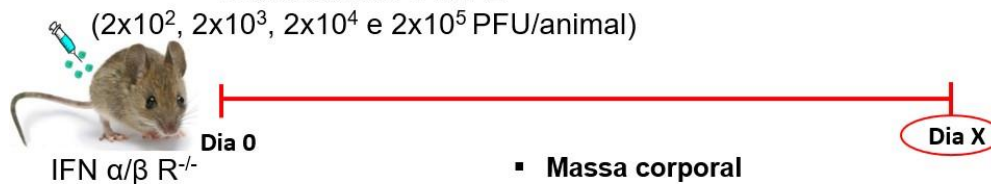


Figura 23- Estratégia experimental para definição do inóculo viral no modelo proposto. Para a definição do inóculo do DENV-3 a ser utilizado nos experimentos, camundongos A129 machos e fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas foram divididos em 5 grupos de 6 animais cada, sendo 1 grupo controle (não-infectado) e 4 grupos infectados com um inóculos diferentes do DENV-3, a saber 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 ou 2×10^5 PFU/animal. Todos os grupos foram acompanhados diariamente para avaliação de massa corporal e letalidade. Foi escolhido para as estratégias subsequentes o menor inóculo do DENV-3 onde houve 100% de letalidade dos camundongos infectados.

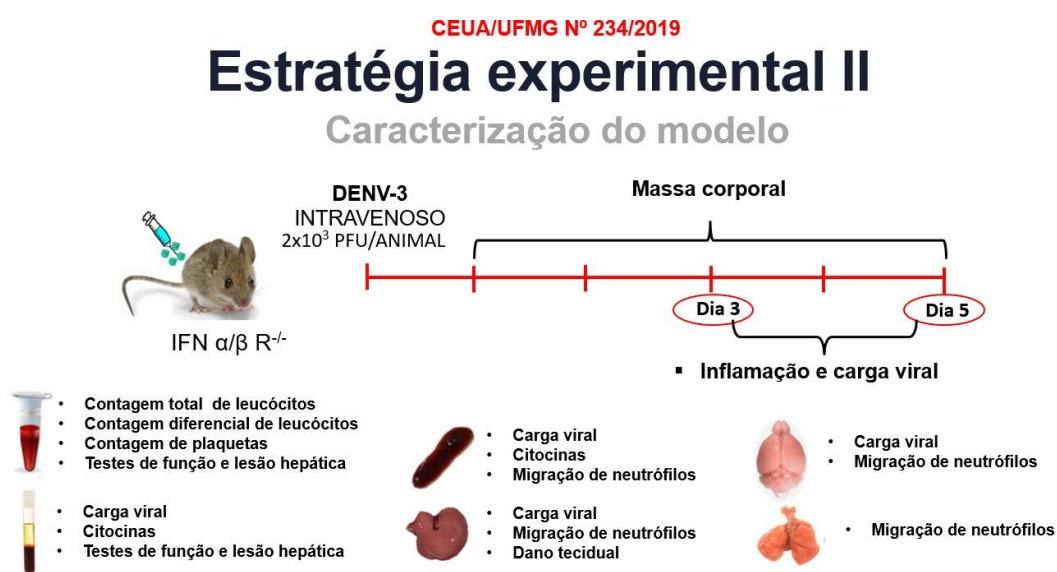


Figura 24- Estratégia experimental para caracterização do modelo de infecção com o inóculo escolhido na estratégia I. Para avaliação das alterações provocadas pela infecção utilizando o inóculo definido na estratégia experimental I, camundongos A129 machos e fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas foram divididos em 2 grupos de 12 animais cada, a saber Controle e DENV-3 sendo que metade de cada grupo foi eutanasiada ao 3º dia após a infecção do grupo DENV-3 e a outra metade ao 5º dia após a infecção do grupo DENV-3. Foram analisados parâmetros inflamatórios em ambos os grupos e carga viral no grupo DENV-3, a fim de determinar quais foram as alterações consequentes da infecção.

CEUA/UFMG Nº 234/2019

Estratégia experimental III

Avaliação da permeabilidade vascular no modelo de infecção estabelecido

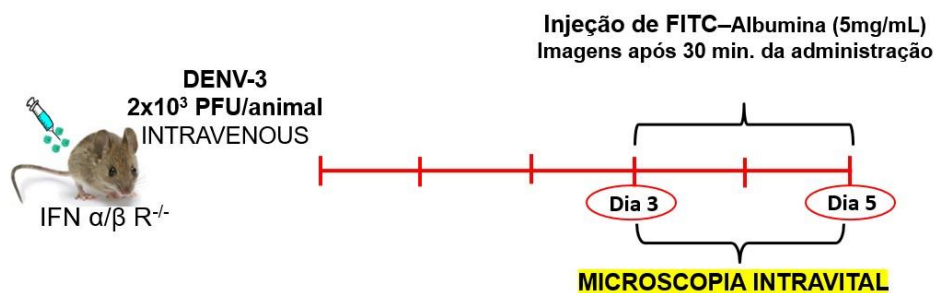


Figura 25- Estratégia experimental para análise da permeabilidade vascular no modelo proposto.

Para a identificação de possível aumento na permeabilidade vascular no modelo, camundongos A129 machos e fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas foram novamente divididos em 2 grupos de 6 animais cada, a saber Controle e DENV- sendo que metade cada grupo foi eutanasiada ao 3º dia após a infecção do grupo DENV-3 e a outra metade ao 5º dia após a infecção do grupo DENV-3. Nestes time points os camundongos receberam por via intravenosa solução de FITC-Albumina (5mg/mL) e foram anestesiados após 30 minutos para realização de laparotomia para exposição do fígado (lobo lateral esquerdo), onde foram realizadas imagens em microscópio confocal para identificação de extravasamento plasmático.

CEUA/UFMG Nº 234/2019

Estratégia experimental IV

Definição da concentração de uso do peptídeo

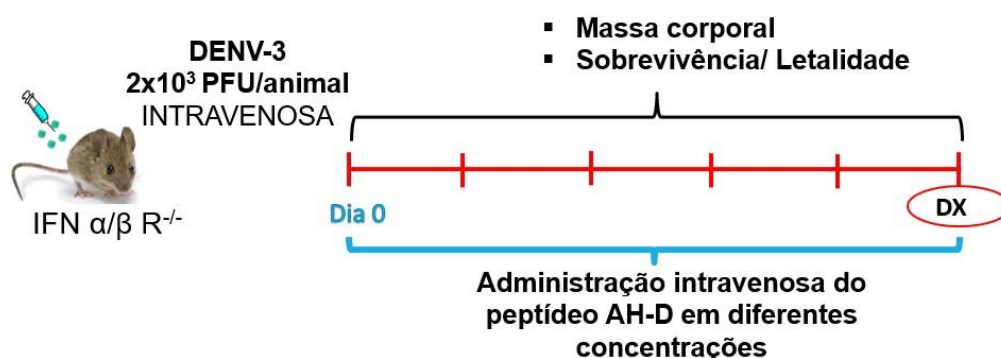


Figura 26- Estratégia experimental para escolha da dose de administração do peptídeo. Para a definição da dose do peptídeo AH-D a ser administrada, camundongos A129 machos e fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas foram divididos em 6 grupos de 6 animais cada, sendo 1 grupo controle negativo (não-infectado), 1 grupo controle positivo (infectado não-tratado) e 4 grupos infectados e

tratados com diferentes doses do peptídeo AH-D a saber- 25, 12.5, 6.25 ou 3.125mg/kg, por via intravenosa todos os dias até o fim do experimento. Os camundongos foram acompanhados diariamente para análise da massa corporal e letalidade. A dose do peptídeo foi definida de acordo com seu impacto na redução da letalidade dos animais infectados.

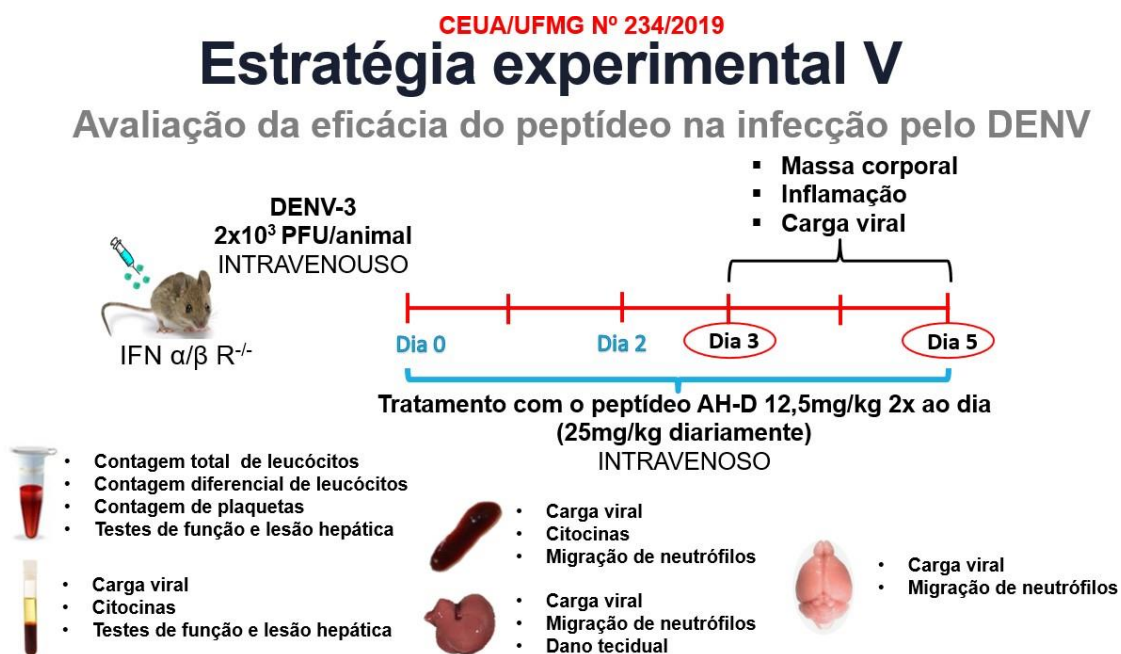


Figura 27- Estratégia experimental para avaliação do potencial antiviral e terapêutico do tratamento com o peptídeo AH-D na infecção pelo DENV-3 in vivo. Para avaliação do potencial terapêutico do peptídeo AH-D na infecção pelo DENV-3, camundongos A129 machos e fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas foram divididos em 4 grupos de 6 animais cada, a saber- Controle, DENV-3, DENV-3 + AH-D PRE (Tratado a partir do dia 0), e DENV-3 + AH-D PÓS (Tratado a partir do dia 2 após a infecção). Ao 3º e 5º dia os animais foram eutanasiados e amostras foram coletadas para análise dos parâmetros inflamatórios e carga viral nestes animais.

4.11 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão médio (EPM) por grupo de 6, assim como definido no cálculo amostral aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t não paramétrico ou a análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM (GraphPad Software, EUA). Os níveis de significância foram estabelecidos em $p < 0,05$.

4.12 Pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica e a obtenção de artigos em formato eletrônico foram realizadas ao longo de todo o trabalho por meio da base de dados do Portal Medline/Pubmed, no endereço < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>> e do Portal de Periódicos da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Capes/Mec), no endereço- < <https://www-periodicos-capes-gov-br.ez1.periodicos.capes.gov.br/index.php?>>. 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 chave utilizadas foram- “Dengue, antiviral, treatment, infection”.

V. RESULTADOS

Demonstramos em trabalho publicado em 2018 intitulado “Therapeutic treatment of Zika virus infection using a brain-penetrating antiviral peptide” a atividade antiviral do peptídeo AH-D contra o vírus da zika (*in vivo*) e também contra outros *Flavivirus* (*in vitro*). Estes resultados foram então reproduzidos em nosso laboratório com o novo estoque do peptídeo obtido para diferentes arbovírus relacionados, conforme demonstrado a seguir.

I. O peptídeo AH-D apresentou atividade antiviral contra diversos arbovírus *in vitro*

O tratamento de células Vero CCL-81 infectadas com o peptídeo AH-D foi capaz de reduzir a carga viral viável presente no sobrenadante das culturas de células em diferentes concentrações. A atividade antiviral foi mais acentuada contra os *Flavivirus* (Figuras 28, 29 e 30) em comparação com os *Alphavirus* testados (Figuras 31 e 32), com concentração inibitória mais alta. Apesar da viabilidade celular ter sido afetada pela exposição ao peptídeo, houve redução da enzima LDH no sobrenadante das culturas infectadas submetidas ao tratamento, o que indica uma redução da morte celular de forma indireta.

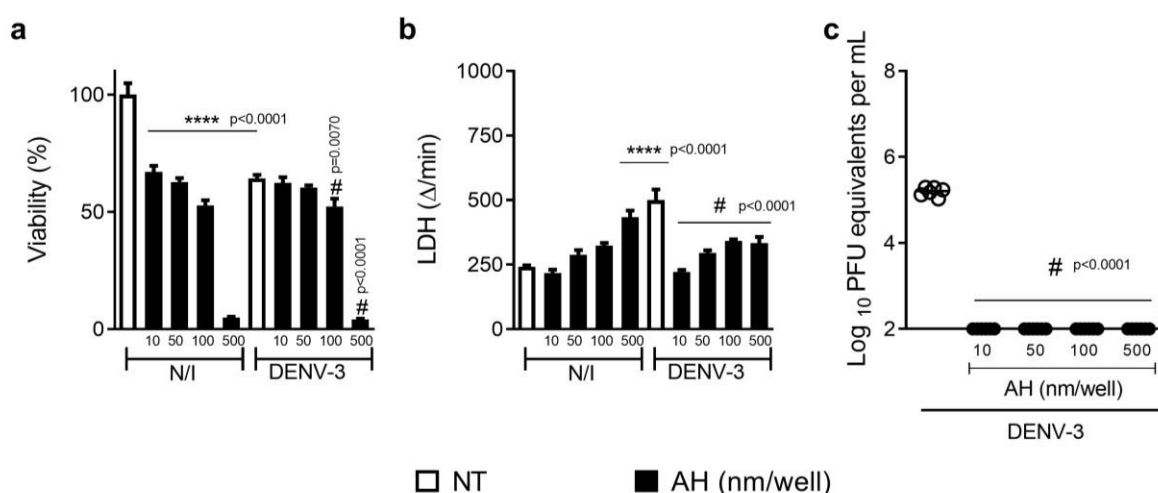


Figura 28- Efeito do tratamento com o peptídeo AH-D em células infectadas pelo DENV-3. Células Vero CCL-81 foram infectadas pelo DENV-3 com MOI=1 e tratadas ou não com peptídeo AH-D em diferentes concentrações. **(a)** Viabilidade celular expressa em porcentagem de células viáveis. **(b)** Níveis da enzima LDH no sobrenadante das células expressa em Δ/min. **(c)** Carga viral viável no

sobrenadante expressa em PFU/mL. As análises empregadas foram One-way ANOVA (em **a** e **b**) e Kruskal- Wallis (em **c**). Os resultados foram expressos como média + erro padrão da média em **a** e **b** e mediana em **c**. O símbolo asterisco “*” foi utilizado para expressar diferenças significativas dos grupos comparados com o grupo não-infectado (NI)/não tratado (NT) (controle negativo de vírus e células) e o símbolo cerquilha “#” para expressar diferenças significativas dos grupos infectados e tratados em comparação com o grupo infectado não-tratado (controle positivo de vírus). Os valores de p foram especificados na figura.

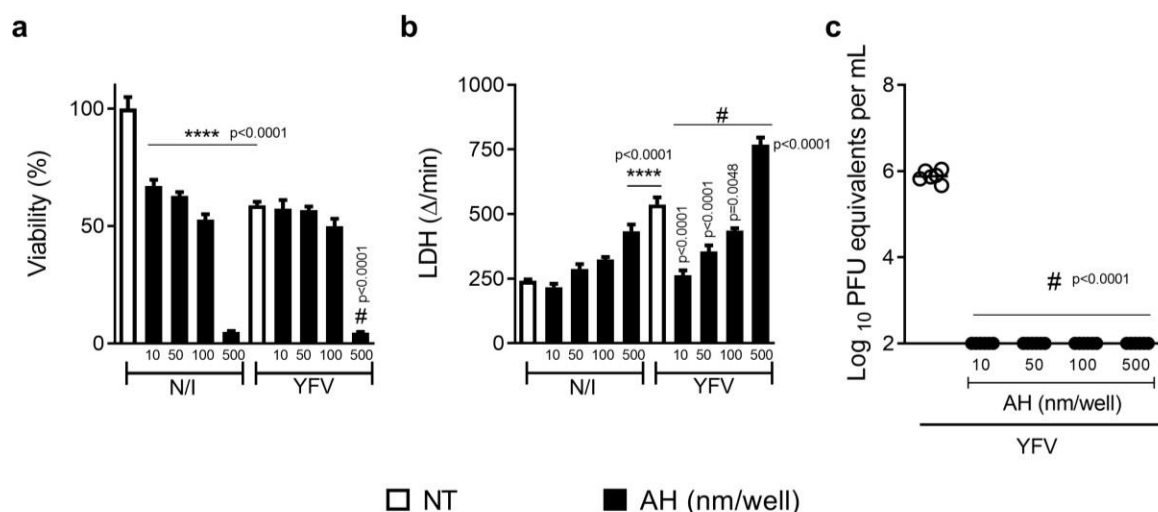


Figura 29- Efeito do tratamento com o peptídeo AH-D em células infectadas pelo YFV. Células Vero CCL-81 foram infectadas pelo YFV com MOI=1 e tratadas ou não com peptídeo AH-D em diferentes concentrações. **(a)** Viabilidade celular expressa em porcentagem de células viáveis. **(b)** Níveis da enzima LDH no sobrenadante das células expressa em Δ/min. **(c)** Carga viral viável no sobrenadante expressa em PFU/mL. As análises empregadas foram One-way ANOVA (em **a** e **b**) e Kruskal- Wallis (em **c**). Os resultados foram expressos como média + erro padrão da média em **a** e **b** e mediana em **c**. O símbolo asterisco “*” foi utilizado para expressar diferenças significativas dos grupos comparados com o grupo não-infectado (NI)/não tratado (NT) (controle negativo de vírus e células) e o símbolo cerquilha “#” para expressar diferenças significativas dos grupos infectados e tratados em comparação com o grupo infectado não-tratado (controle positivo de vírus). Os valores de p foram especificados na figura.

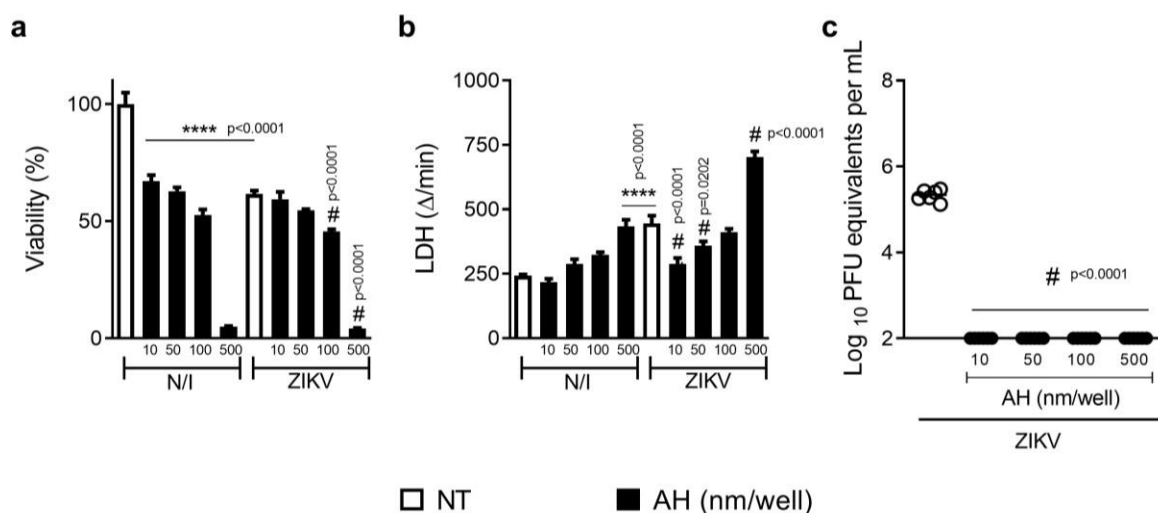


Figura 30- Efeito do tratamento com o peptídeo AH-D em células infectadas ou não com o ZIKV.

Células Vero CCL-81 foram infectadas pelo ZIKV com MOI=1 e tratadas ou não com peptídeo AH-D em diferentes concentrações. **(a)** Viabilidade celular expressa em porcentagem de células viáveis. **(b)** Níveis da enzima LDH no sobrenadante das células expressa em Δ /min. **(c)** Carga viral viável no sobrenadante expressa em PFU/mL. As análises empregadas foram One-way ANOVA (em **a** e **b**) e Kruskal- Wallis (em **c**). Os resultados foram expressos como média + erro padrão da média em **a** e **b** e mediana em **c**. O símbolo asterisco “*” foi utilizado para expressar diferenças significativas dos grupos comparados com o grupo não-infectado (NI)/não tratado (NT) (controle negativo de vírus e células) e o símbolo cerquilha “#” para expressar diferenças significativas dos grupos infectados e tratados em comparação com o grupo infectado não-tratado (controle positivo de vírus). Os valores de p foram especificados na figura.

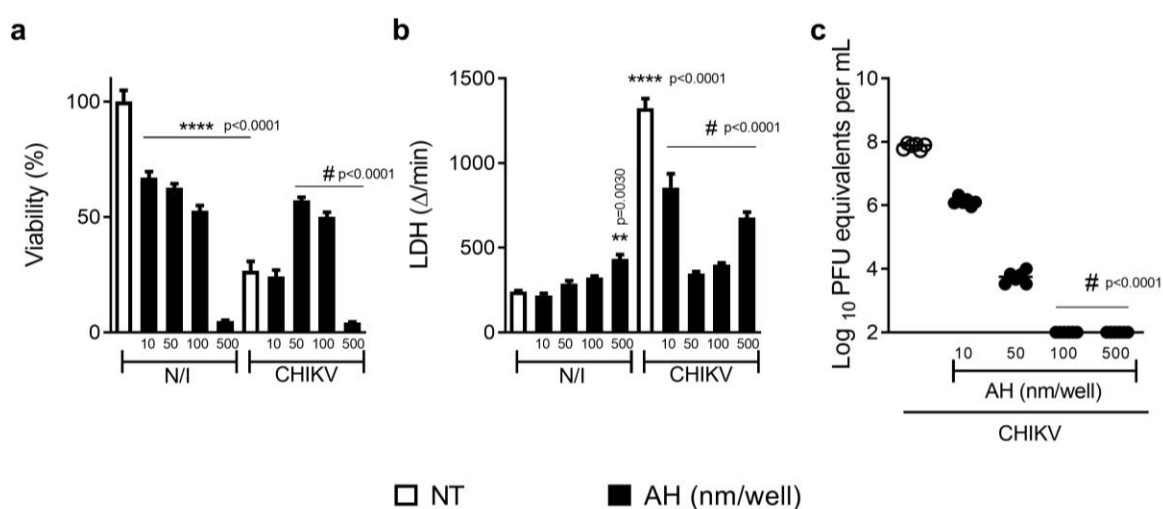


Figura 31- Efeito do tratamento com o peptídeo AH-D em células infectadas ou não com o CHIKV.

Células Vero CCL-81 foram infectadas pelo CHIKV com MOI=1 e tratadas ou não com peptídeo AH-D em diferentes concentrações. **(a)** Viabilidade celular expressa em porcentagem de células viáveis. **(b)**

Níveis da enzima LDH no sobrenadante das células expressa em Δ/min . **(c)** Carga viral viável no sobrenadante expressa em PFU/mL. As análises empregadas foram One-way ANOVA (em **a** e **b**) e Kruskal- Wallis (em **c**). Os resultados foram expressos como média + erro padrão da média em **a** e **b** e mediana em **c**. O símbolo asterisco “*” foi utilizado para expressar diferenças significativas dos grupos comparados com o grupo não-infectado (NI)/não tratado (NT) (controle negativo de vírus e células) e o símbolo cerquilha “#” para expressar diferenças significativas dos grupos infectados e tratados em comparação com o grupo infectado não-tratado (controle positivo de vírus). Os valores de p foram especificados na figura.

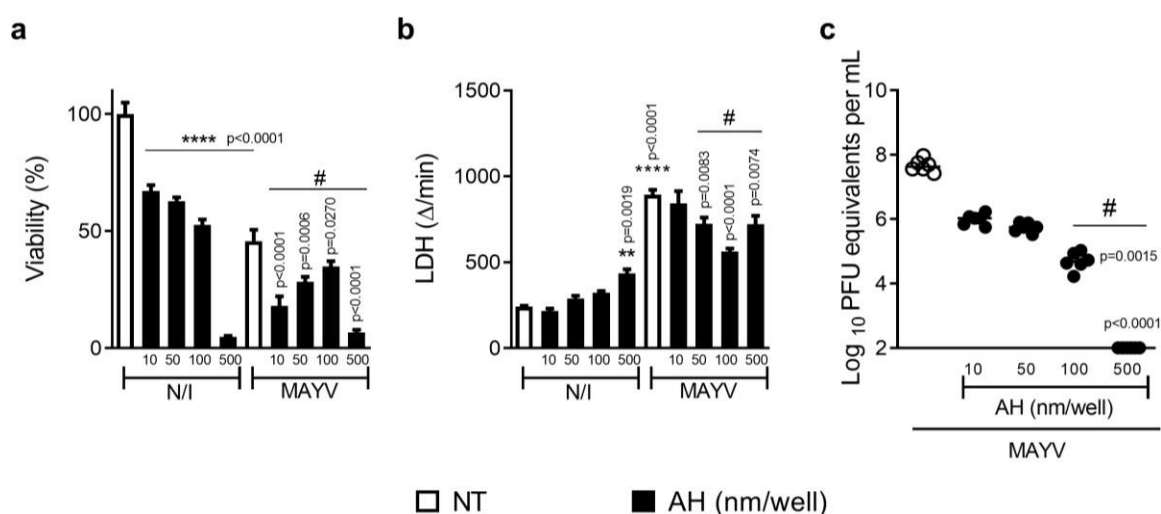


Figura 31- Efeito do tratamento com o peptídeo AH-D em células infectadas ou não com o MAYV. Células Vero CCL-81 foram infectadas pelo MAYV com MOI=1 e tratadas ou não com peptídeo AH-D em diferentes concentrações. **(a)** Viabilidade celular expressa em porcentagem de células viáveis. **(b)** Níveis da enzima LDH no sobrenadante das células expressa em Δ/min . **(c)** Carga viral viável no sobrenadante expressa em PFU/mL. As análises empregadas foram One-way ANOVA (em **a** e **b**) e Kruskal- Wallis (em **c**). Os resultados foram expressos como média + erro padrão da média em **a** e **b** e mediana em **c**. O símbolo asterisco “*” foi utilizado para expressar diferenças significativas dos grupos comparados com o grupo não-infectado (NI)/não tratado (NT) (controle negativo de vírus e células) e o símbolo cerquilha “#” para expressar diferenças significativas dos grupos infectados e tratados em comparação com o grupo infectado não-tratado (controle positivo de vírus). Os valores de p foram especificados na figura.

Em seguida, buscamos avaliar o potencial do AH-D contra o DENV *in vivo*. Sabendo que o modelo de infecção em camundongos A129 é padrão ouro para a avaliação de drogas antivirais (ROTHMAN et al., 2011; ZOMPI et al., 2012) nossa primeira estratégia foi identificar qual seria o inoculo ideal para avaliação do peptídeo AH-D no modelo.

Camundongos A129 machos e fêmeas foram infectados com diferentes inóculos do DENV-3 e acompanhados diariamente. Ao final do experimento observamos que os grupos infectados com inóculos mais altos (2×10^5 e 2×10^4 PFU) apresentaram elevado percentual de morbimortalidade em um período curto de tempo (5 dias), o que poderia dificultar a análise da eficácia dos tratamentos testados no modelo. Em contrapartida, o inóculo mais baixo (2×10^2 PFU), apesar de causar perda de peso similar ao inóculo de 10^3 levou à mortalidade de menos de 50% dos animais infectados no sexto dia após a infecção, porém os animais sobreviventes atingiram perda de massa superior a 20% da massa inicial e tiveram que ser eutanasiados no sétimo dia. Optamos então por utilizar o inóculo intermediário que apresentou 100% de letalidade dos animais (2×10^3 PFU) até o sétimo dia pós-infecção de forma homogênea. Na figura 32 estão demonstradas as alterações da massa corporal (a) e o percentual de sobrevivência (b) dos animais conforme a estratégia experimental I.

II. A infecção com 2×10^3 PFU do DENV-3 foi capaz de induzir alterações clínicas características da dengue, incluindo plaquetopenia, viremia e extravasamento plasmático em camundongos A129

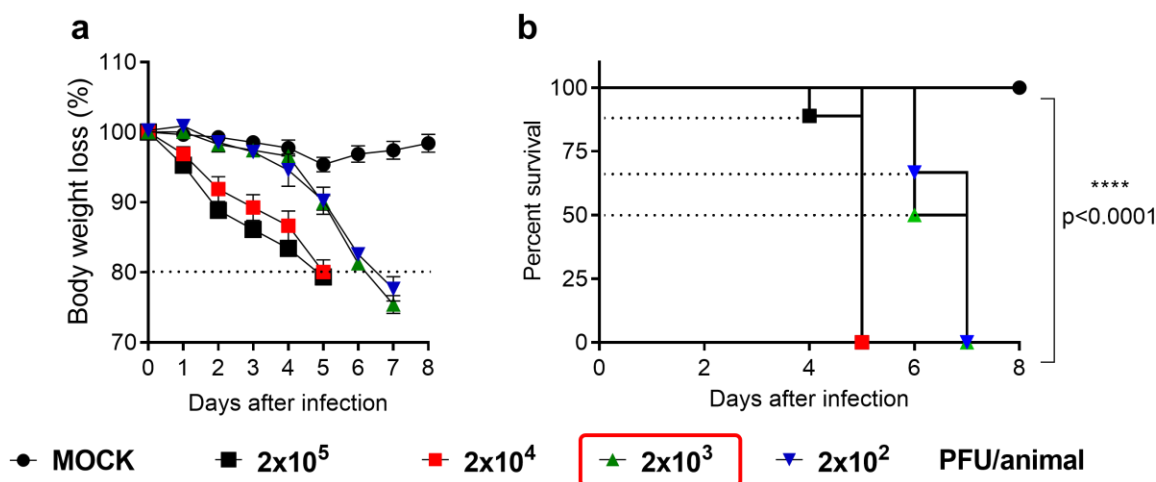


Figura 32- A infecção de camundongos A129 pelo DENV-3 leva a morbimortalidade em todos os inóculos administrados. Camundongos A129 foram infectados com diferentes inóculos do DENV-3, a saber- 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 e 2×10^5 PFU e acompanhados diariamente até sucumbir a infecção ou atingir perda de massa corporal superior a 20% da massa inicial (n=5 para Mock; n=6 para cada um dos demais grupos). **(a)** Avaliação da massa corporal diária expressa em % de perda. **(b)** Avaliação diária da curva de sobrevivência. Ambos os resultados foram expressos em média + erro padrão da média. Em **a** foi aplicado o teste One-way ANOVA por dia, não havendo diferença estatística entre os grupos.

Em **b** foi aplicado o teste de log-rank (Mantel-Cox), havendo diferença de todos os grupos infectados em relação ao grupo Mock, expressa com o uso do símbolo asterisco “*”. O valor de p foi especificado na figura.

Após a definição do melhor inóculo a ser utilizado, seguimos para a caracterização dos parâmetros virais e imunoinflamatórios do modelo, a fim de identificar as alterações decorrentes da infecção e suas possíveis similaridades com os sinais desenvolvidos pelo hospedeiro humano. Foram analisados parâmetros como o número de plaquetas e leucócitos totais e diferenciais no sangue, presença de dano hepático, migração de neutrófilos para os tecidos-alvo, carga viral em diversos sítios e níveis de mediadores inflamatórios, demonstrados nas figuras 33, 34 e 35 a seguir.

Nossos resultados demonstram que camundongos A129 infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3 apresentaram perda de massa corporal significativa quando comparados ao grupo Controle (Figura 33 a). Esse parâmetro foi acompanhado de alterações significativas no número de leucócitos circulantes no 6º dia após a infecção (Figura 33 b) quando houve intenso aumento no número de neutrófilos circulantes em comparação com o grupo controle, além do aumento no número de linfócitos e monócitos em comparação com o grupo eutanasiado ao 3º dia após a infecção (Figura 33 c). Ademais, ao 3º dia após infecção os animais já apresentavam plaquetopenia (Figura 33 d), dano hepático (Figura 33 e) e consequente diminuição da função hepática (Figura 33 f) significativos que persistiram até o 6º dia.

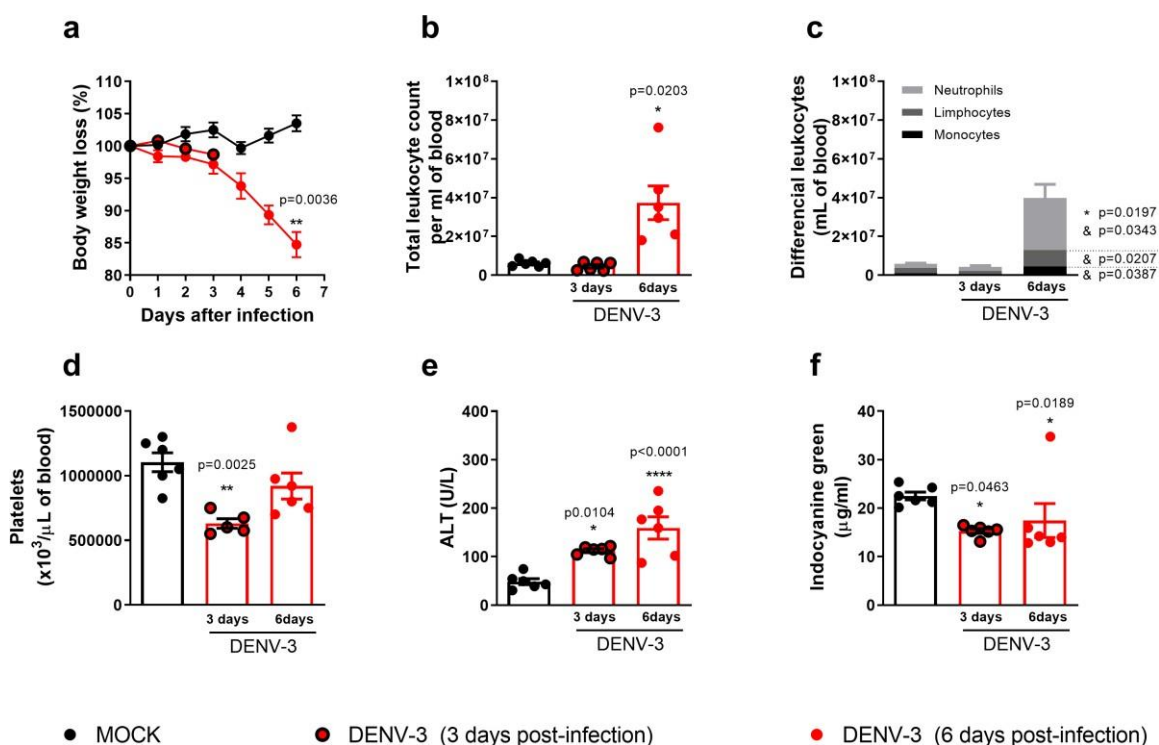


Figura 33- A infecção pelo DENV-3 em camundongos A129 induz perda de massa corporal, plaquetopenia, lesão hepática e leucocitose. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e eutanasiados ao 3º e 6º dia após a infecção para análise de carga viral e alterações imunoinflamatórias ($n=6$ para Mock; $n=6$ para os demais grupos). **(a)** Avaliação da massa corporal diária expressa em % de perda. **(b)** Contagem de leucócitos totais no sangue expressa por mL. **(c)** Contagem de leucócitos diferenciais no sangue expressa por mL. **(d)** Contagem de plaquetas circulantes no sangue expressa por μL . **(e)** Dosagem da enzima ALT no plasma expressa em U/L para teste de lesão hepática. **(f)** Dosagem de verde indocianina no plasma expressa em $\mu\text{g/mL}$ para teste de função hepática. Ambos os resultados foram expressos em média + erro padrão da média. Em **a** e **e** foi aplicado o teste One-way ANOVA. Em **b**, **d** e **f** foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Por fim, em **c** foi aplicado o teste Two-way ANOVA. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. As diferenças encontradas entre os grupos DENV-3 foram expressas com o uso do símbolo ampersand “&”. Os valores de p foram especificados na figura.

Ao analisarmos o recrutamento de neutrófilos para os tecidos dos animais controles e infectados através da medida indireta da enzima mieloperoxidase nos tecidos, identificamos que no 3º dia após a infecção já houveram alterações significativas nos níveis desta enzima no baço (Figura 34 a) e no 6º dia no fígado (Figura 34 b) dos animais infectados. Em contrapartida, não foram identificadas alterações significativas nos níveis desta enzima no cérebro e pulmões destes animais (Figura 34 c-d).

Acerca da carga viral, foram detectadas partículas viáveis do DENV em seus

principais alvos sistêmicos no 3º dia após a infecção (Figura 34 e-g). Ao 6º dia partículas viáveis só foram detectadas no cérebro destes animais (Figura 34 h).

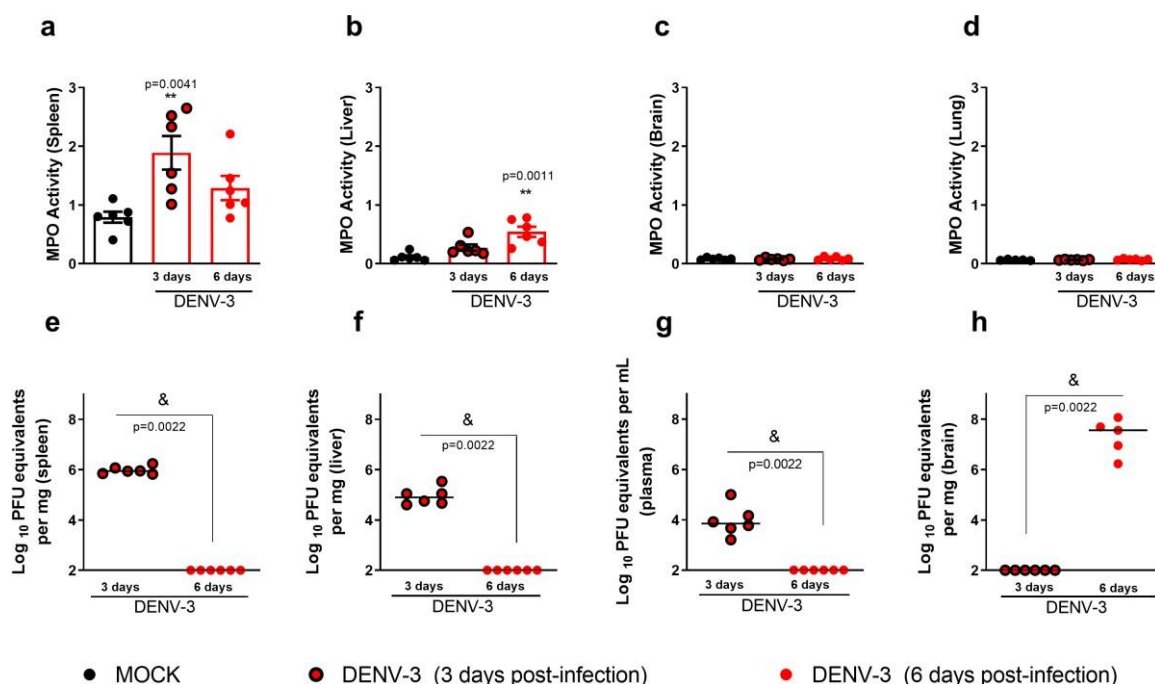


Figura 34- Animais infectados pelo DENV-3 apresentaram recrutamento de neutrófilos para os tecidos e viremia. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e eutanasiados ao 3º e 6º dia após a infecção para análise de carga viral e alterações imunoinflamatórias (n=6 para Mock; n=6 para os demais grupos). **(a-d)** Dosagem da enzima mieloperoxidase no baço, fígado, cérebro e pulmão, respectivamente (média + erro padrão da média). **(e-h)** Carga viral viável expressa em PFU/mg de tecido ou PFU/mL de plasma (mediana). Em **a** e **b** foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Em **c** e **d** foi aplicado o teste One-way ANOVA. Por fim, em **e**, **f**, **g** e **h** foi aplicado o teste de Mann-Whitney. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. As diferenças encontradas entre os grupos DENV-3 foram expressas com o uso do símbolo ampersand “&”. Os valores de p foram especificados na figura.

Acerca dos níveis de citocinas e quimiocinas em camundongos controle e infectados, houve um aumento significativo da citocina IFN- γ e da quimiocina CCL2 no plasma já no 3º dia após a infecção, o que perdurou até o 6º dia (Figura 35 b-d). Em contrapartida o aumento das citocinas IL-6 e IL-1 β só foi observado no 6º dia no plasma. No baço, o perfil da quimiocina CCL2 foi semelhante ao observado no plasma, com aumento significativo a partir do 3º dia após a infecção, perdurando até o 6º dia. Por fim, os níveis de IFN- γ no baço de animais infectados não sofreram alterações quando comparados ao grupo controle, em nenhum dos tempos avaliados.

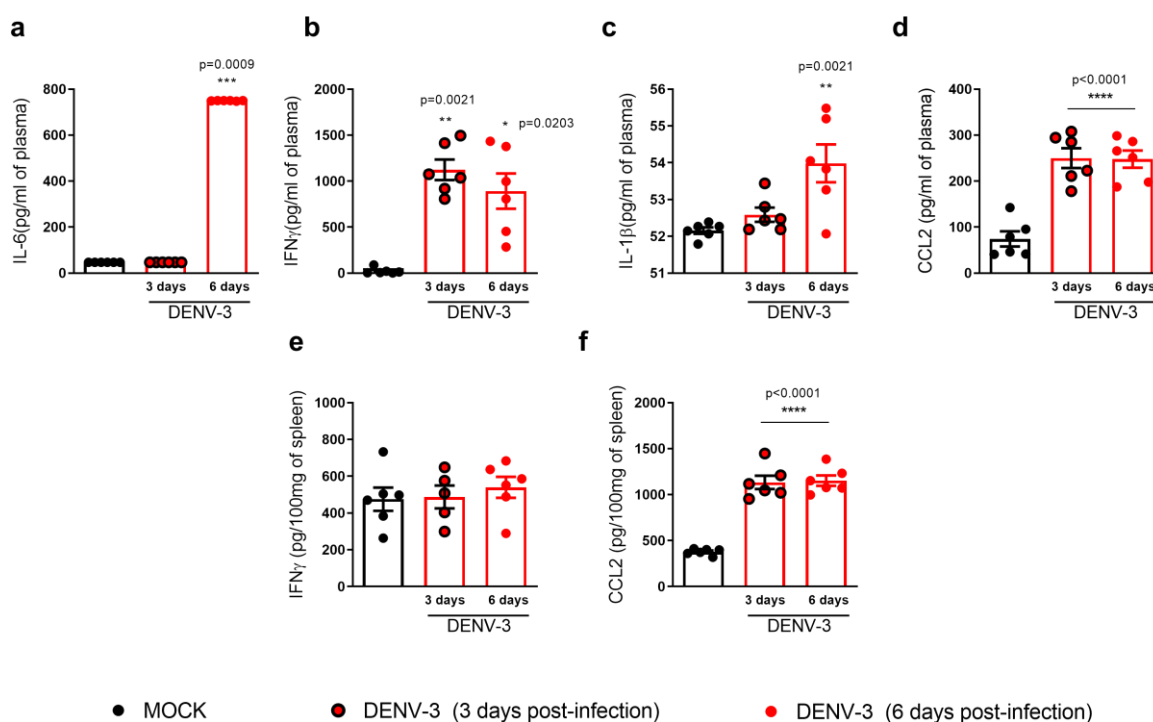


Figura 35- A infecção pelo DENV-3 induziu o aumento de citocinas/quimiocinas no plasma e baço. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e eutanasiados ao 3º e 6º dia após a infecção para análise de carga viral e alterações imunoinflamatórias ($n=6$ para Mock; $n=6$ para os demais grupos). **(a-d)** Dosagem das citocinas IL-6, IFN- γ , IL-1 β e da quimiocina CCL2 no plasma expressas em pg/ml. **(e-f)** Dosagem da citocina IFN- γ , e da quimiocina CCL2 no baço expressas em pg/100mg de tecido. Ambos os resultados foram expressos por média + erro padrão da média. Em **a** e **b** foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Em **c** a **f** foi aplicado o teste One-way ANOVA. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. Os valores de p foram especificados na figura.

Por fim foi realizada análise histopatológica do fígado dos animais e análise de extravasamento vascular através de microscopia confocal. Na análise histopatológica foram identificadas alterações teciduais caracterizadas por lesões leves com infiltrado celular considerável já no 3º dia após infecção, significativamente mais intenso no 6º dia após a infecção (Figura 36 a-b). Estes dados corroboram o aumento da MPO no fígado demonstrado anteriormente (Figura 34 b). Interessantemente, ao 3º dia após infecção ainda há certa heterogeneidade na intensidade das alterações, o que muda ao 6º dia, quando os animais infectados apresentam alterações teciduais de forma homogênea (Figura 34 b).

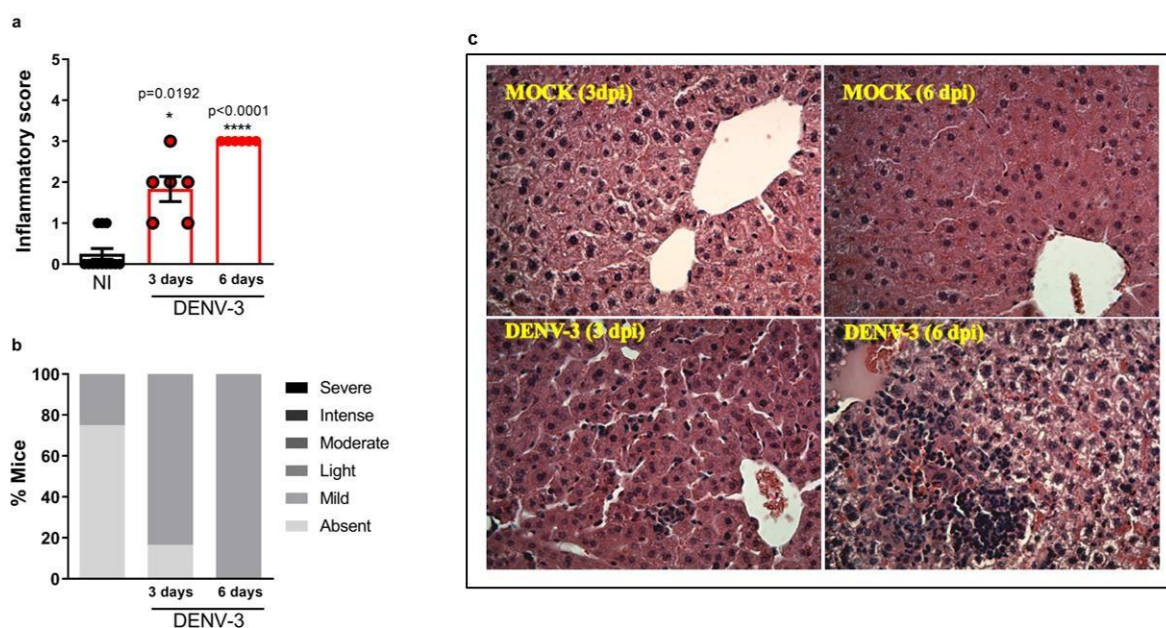


Figura 36- Animais infectados pelo DENV-3 apresentaram infiltrado celular no tecido hepático.

Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e eutanasiados ao 3º e 6º dia após a infecção para análise de carga viral e alterações imunoinflamatórias ($n=6$ para Mock; $n=6$ para os demais grupos). **(a)** Quantificação do infiltrado inflamatório no fígado. **(b)** Percentual de camundongos de acordo com o grau de infiltrado inflamatório no fígado. **(c)** Coloração H&E representativas de **a**, mostrando o infiltrado inflamatório no 3º e 6º d.p.i. Os resultados **a** e **b** foram expressos por média + erro padrão da média. Em **a** foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. O valor de p foi especificado na figura.

Alterações da permeabilidade vascular nos animais infectados só foram observadas ao 6º dia após infecção (Figura 37 c), com intenso acúmulo de FITC-Albumina no tecido hepático decorrente do extravasamento plasmático. Na figura 37 (d) vemos a representação gráfica das imagens obtidas nesta análise.

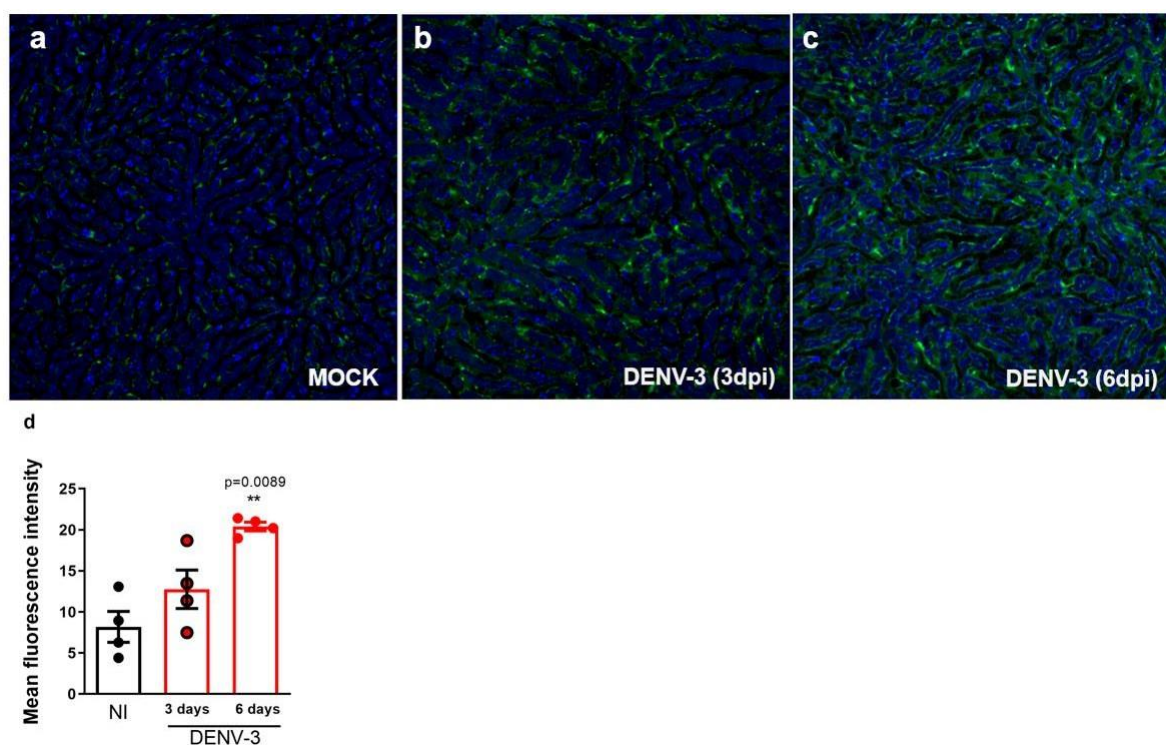


Figura 37- A infecção pelo DENV-3 induziu extravasamento plasmático em animais A129.

Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e eutanasiados ao 3º e 6º dia após a infecção para análise da permeabilidade vascular por microscopia confocal ($n=4$ para Mock; $n=4$ para os demais grupos). **(a-c)** Imagens representativas do tecido hepático na ausência e presença de extravasamento plasmático correlacionado com a deposição de FITC-Albumina no espaço intersticial. **(d)** Média da intensidade de fluorescência nas imagens adquiridas. A intensidade foi medida pela média de 10 áreas no espaço intersticial. Em **d** foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e os resultados foram expressos por média + erro padrão da média. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “**”. O valor de p foi especificado na figura.

A fim de avaliar o potencial antiviral do peptídeo AH-D *in vivo*, iniciamos então a estratégia experimental IV, para determinar qual seria a dose ideal do peptídeo a administrada nos experimentos subsequentes. Como se pode observar na Figura 38, o tratamento resultou em redução de mortalidade em todas as doses administradas, sendo que o tratamento com 25mg/kg se mostrou mais eficiente, com maior percentual de animais sobreviventes (~90%).

III. O tratamento com o peptídeo AH-D foi capaz de reduzir a letalidade de camundongos infectados em todas as doses administradas

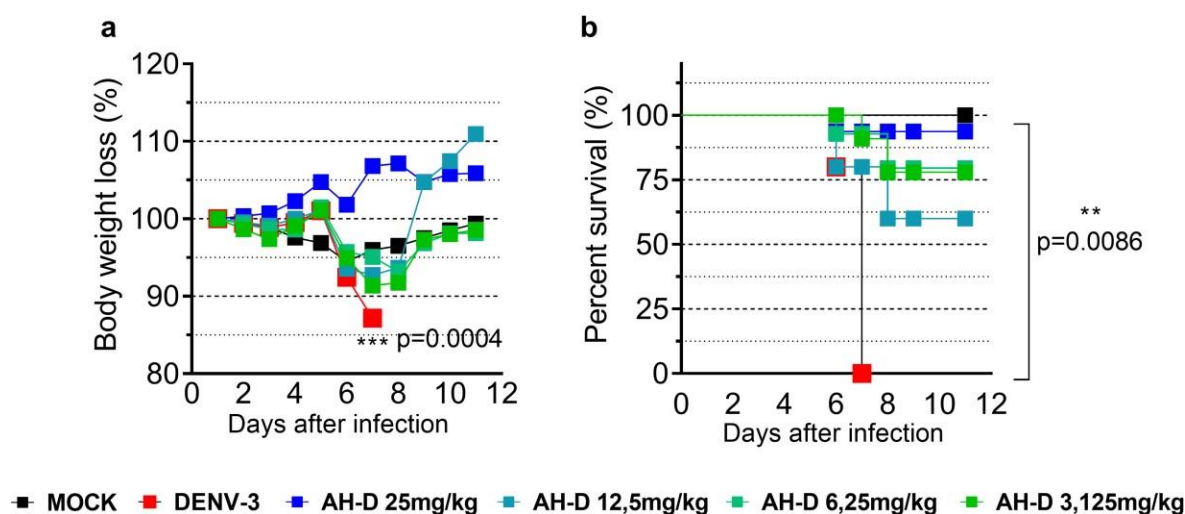


Figura 38- Animais infectados pelo DENV-3 submetidos ao tratamento com AH-D apresentaram redução da perda de massa corporal e do percentual de letalidade. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e tratados com diferentes doses do peptídeo AH-D a saber- 25, 12.5, 6.25 ou 3.125 mg/kg, por via intravenosa, diariamente do início ao fim do experimento (n=4 para Mock; n=4 para os demais grupos). **(a)** Avaliação da massa corporal diária expressa em % de perda. **(b)** Avaliação diária da curva de sobrevivência. Ambos os resultados foram expressos em média + erro padrão da média. Em **a** foi aplicado o teste One-way ANOVA. Em **b** foi aplicado o teste de log-rank (Mantel-Cox). As diferenças encontradas foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. Os valores de p foram especificados na figura.

Uma vez definida a quantidade do peptídeo a ser administrada, realizamos um experimento de avaliação da toxicidade da dose escolhida (25mg/kg) em camundongos não-infectados (Figura 39). Nossas análises incluíram o monitoramento da massa corporal dos animais, histologia do fígado, cérebro, pulmão e rim. Além disso foram dosadas a ALT e creatinina no plasma. Não foram identificadas alterações em nenhum dos parâmetros analisados. Paralelamente também foram realizados testes de toxicidade do peptídeo em cães da raça Beagle (CEUA 68/2020), onde os animais foram submetidos ao tratamento com diferentes doses do peptídeo (5, 15 ou 50mg/kg) e acompanhados por 28 dias. Novamente, não foram identificadas alterações significativas nos parâmetros analisados (ANEXO IV).

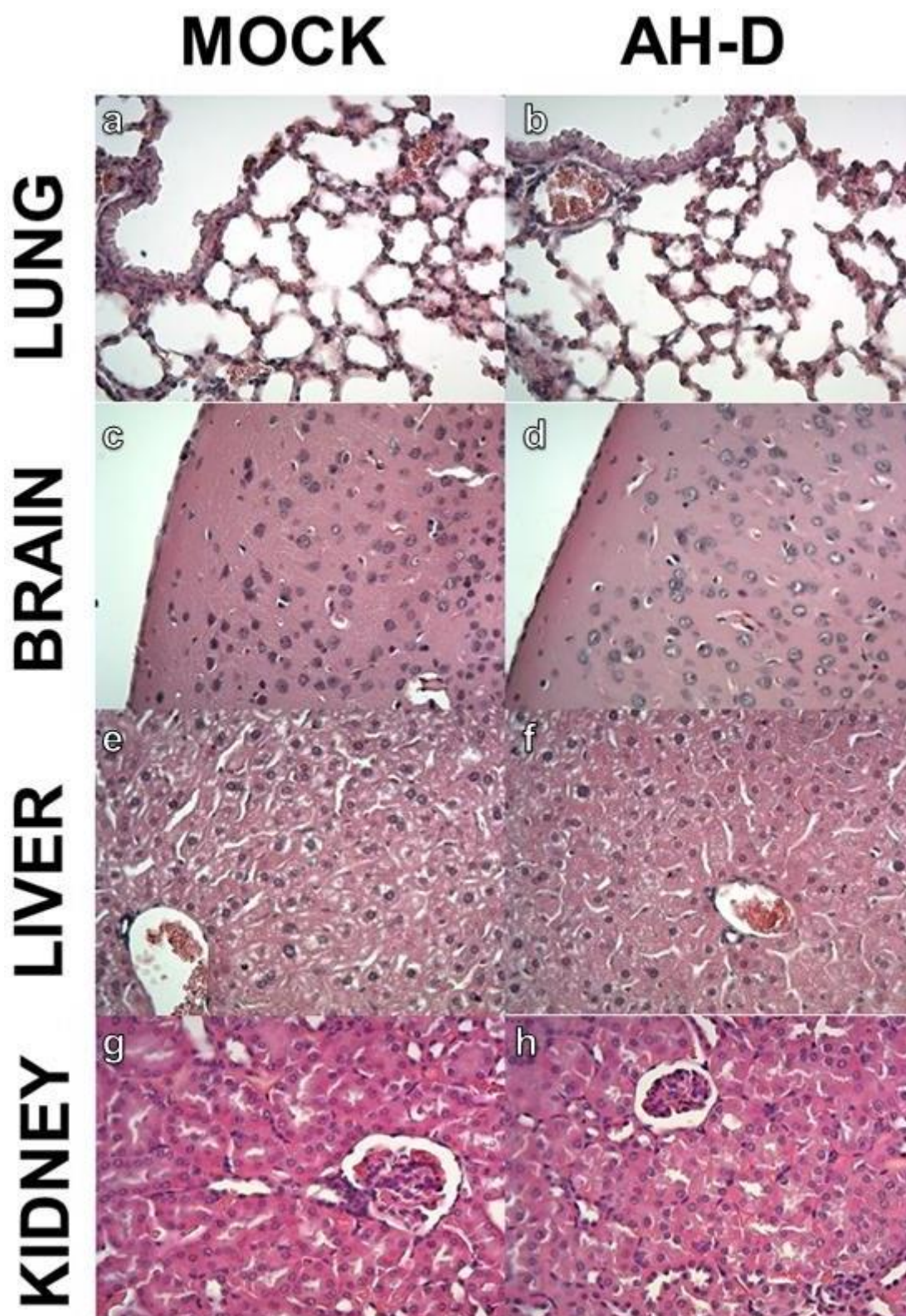


Figura 39- O tratamento com o peptídeo AH-D não provocou alterações teciduais em animais não-infectados submetidos ao tratamento. Camundongos A129 foram tratados com a dose de 25mg/kg do peptídeo AH-D diariamente por um período de 6 dias (n=4 para Mock; n=4 AH-D). (a-b) Coloração H&E representativa do pulmão. (c-d) Coloração H&E representativa do cérebro. (e-f)

Coloração H&E representativa do fígado. **(g-h)** Coloração H&E representativa do rim. Todas as imagens foram obtidas utilizando régua de 40x.

Em seguida, seguimos o planejamento proposto na estratégia experimental V que consistiu na análise dos parâmetros clínicos na presença ou não do tratamento com o peptídeo AH-D.

Para isso os animais foram divididos em 4 grupos, a saber- Mock (Controle não infectado), DENV-3 (Controle positivo), DENV-3 + AH-D pré (Infectado e tratado a partir do dia da infecção), DENV-3 + AH-D pós (Infectado e tratado a partir do 2º dia da infecção). O esquema de tratamento foi definido com base nos resultados publicados por Jackman e colaboradores (2018). Eles demonstraram que a administração do peptídeo 1 hora antes da infecção pelo ZIKV foi capaz de reduzir a letalidade dos animais submetidos ao tratamento quando comparados ao grupo não-tratado. Ademais, o tratamento após a disseminação do vírus (3 dias após a infecção) também se apresentou eficaz, reduzindo os sintomas clínicos, a carga viral e a neuroinflamação. Aqui nossa hipótese foi de que o tratamento no dia da infecção seria capaz de impedir a disseminação do DENV, reduzindo os parâmetros imunoinflamatórios junto com a carga viral, e que o tratamento 2 dias após a infecção seria capaz de reverter o progresso da doença.

IV. O tratamento com o peptídeo AH-D não foi capaz de reduzir a carga viral sistêmica, mas reduziu a carga viral no cérebro de animais A129 infectados pelo DENV-3

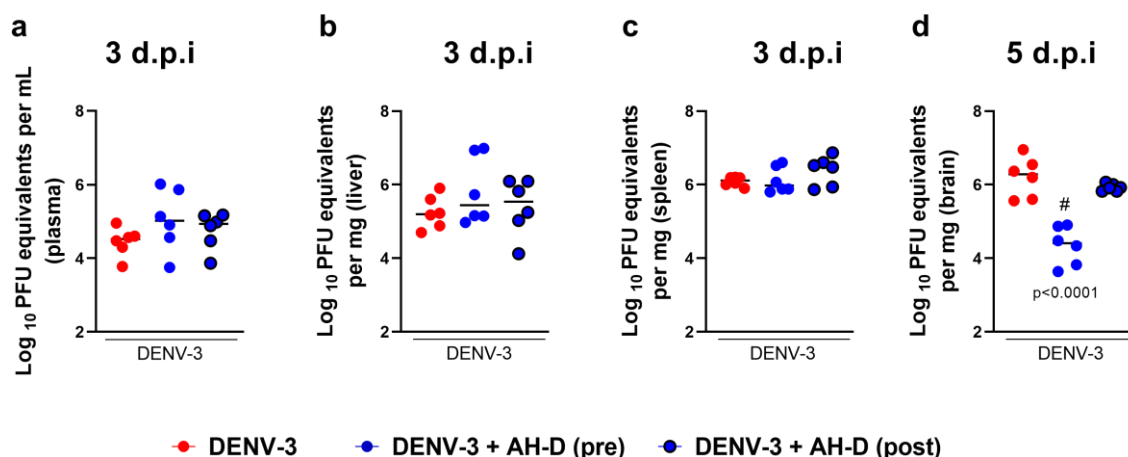


Figura 40- O tratamento com o peptídeo AH-D reduziu a carga viral no cérebro de camundongos

infectados pelo DENV-3. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e tratados com 25 mg/kg do peptídeo AH-D, por via intravenosa, diariamente do início ao fim do experimento ($n=6$ para todos os grupos). **(a)** Carga viral viável expressa em PFU/mL de plasma. **(b-d)** Carga viral viável expressa em PFU/mg de tecido (fígado, baço e cérebro respectivamente). A representação usada foi mediana. Em ambos foi aplicado o teste T ou sua variação não-paramétrica (teste de Mann-Whitney). As diferenças encontradas em relação ao grupo DENV-3 foram expressas com o uso do símbolo cerquilha "#". O valor de p foi especificado na figura.

A administração do peptídeo AH-D não foi capaz de reduzir a carga viral sistêmica (Figura 40 a) dos animais no 3º dia após a infecção, bem como no fígado (Figura 40 b) e baço (Figura 40 c). No entanto, a carga viral no cérebro dos animais submetidos ao tratamento no dia da infecção estava reduzida no 5º dia (Figura 40 c).

V. Animais infectados submetidos ao tratamento não apresentaram plaquetopenia induzida pelo DENV

Outro resultado interessante é demonstrado na Figura 41. Os animais submetidos ao tratamento não apresentaram redução significativa do número de plaquetas como ocorreu com o grupo veículo no 3º dia após a infecção. Este resultado foi ainda mais expressivo no 5º dia após a infecção quando a plaquetopenia foi ainda mais acentuada em animais infectados não-tratados e foram encontradas diferenças significativas entre os grupos veículo e grupos tratados (pré e pós).

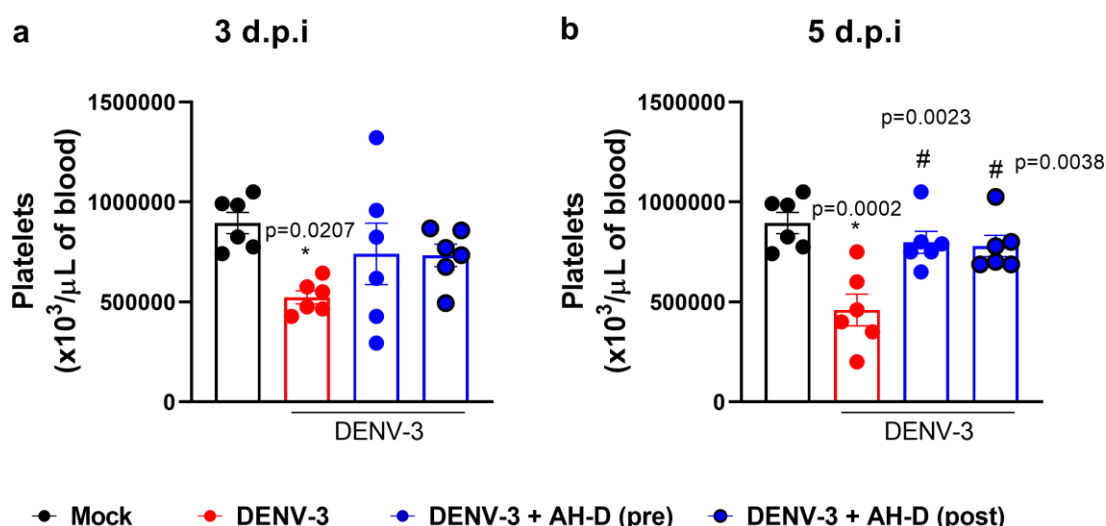


Figura 41- Animais infectados e tratados não apresentaram plaquetopenia. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e tratados com 25 mg/kg do peptídeo AH-D, por via intravenosa, diariamente do início ao fim do experimento ($n=6$ para todos os grupos). **(a)** Contagem de plaquetas circulantes no sangue ao 3º dia após a infecção, expressa por μL . **(b)** Contagem de plaquetas

circulantes no sangue ao 5º dia após a infecção, expressa por μL . A representação usada foi mediana. Em ambos foi aplicado o teste One-way ANOVA. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. As diferenças encontradas em relação ao grupo DENV-3 (veículo) foram expressas com o uso do símbolo cerquilha “#”. Os valores de p foram especificados na figura.

Ao analisar os níveis da MPO no fígado destes animais no 3º dia após a infecção (Figura 42 a), foi possível constatar que os animais infectados tiveram um aumento desta enzima, o que sugere maior influxo de neutrófilos, quando comparados ao grupo controle. Surpreendentemente os animais submetidos ao tratamento apresentaram níveis ainda mais elevados de MPO no fígado quando comparados aos demais grupos, sendo que isso ocorreu de forma mais intensa no grupo que recebeu o tratamento a partir do 2º dia. Esse aumento foi acompanhado de maiores níveis do corante verde indocianina no plasma (Figura 42 b), sugestivo de comprometimento hepático.

VI. Animais submetidos ao tratamento apresentaram aumento do recrutamento celular para o fígado

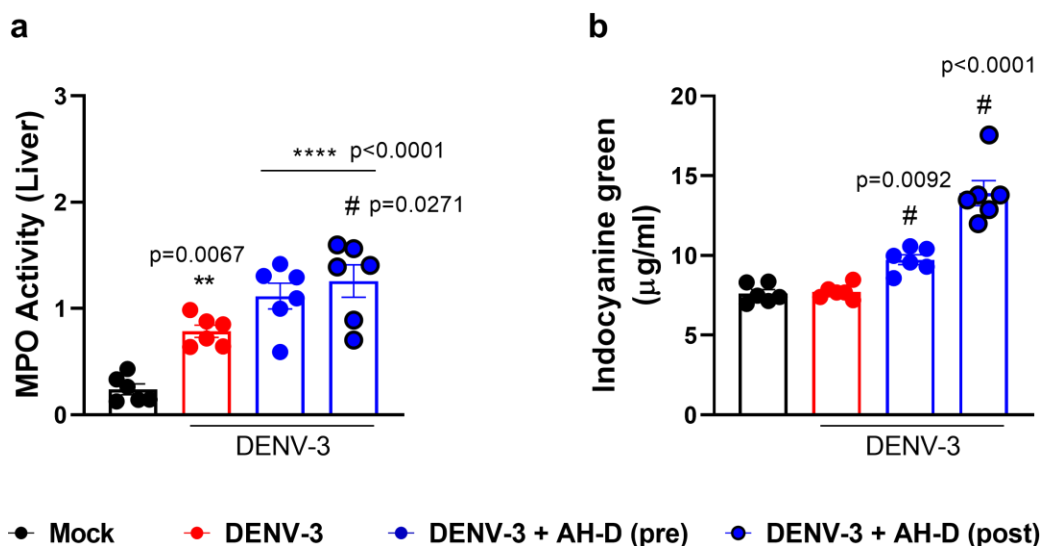


Figura 42- Animais tratados apresentaram aumento do recrutamento de neutrófilos para o fígado e de verde indocianina no plasma. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e tratados com 25 mg/kg do peptídeo AH-D, por via intravenosa, diariamente do início ao fim do experimento (n=6 para todos os grupos). **(a)** Dosagem da enzima mieloperoxidase no fígado. **(b)** Dosagem do corante verde indocianina no plasma expresso em $\mu\text{g}/\text{ml}$. Os resultados foram expressos utilizando média + erro padrão da média. Em ambos foi aplicado o teste One-way ANOVA. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco

“**”. As diferenças encontradas em relação ao grupo DENV-3 (veículo) foram expressas com o uso do símbolo cerquilha “#”. Os valores de p foram especificados na figura.

O tratamento de animais A129 infectados pelo DENV com o peptídeo AH-D levou a um aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 no plasma ao 3º dia após a infecção (Figura 43 a), nos dois esquemas de tratamento aplicados, o que foi observado somente no 6º dia após a infecção em animais não-tratados. Camundongos submetidos ao tratamento desde o dia da infecção apresentaram aumento mais expressivo da quimiocina CCL2 (Figura 43 c), que animais do grupo veículo. Em contrapartida, o tratamento impediu o aumento da citocina IFN- γ (Figura 43 b) e da quimiocina CXCL-1 (Figura 43 d) observados em animais do grupo veículo.

VII. Camundongos infectados submetidos ao tratamento apresentaram alterações no perfil de mediadores inflamatórios

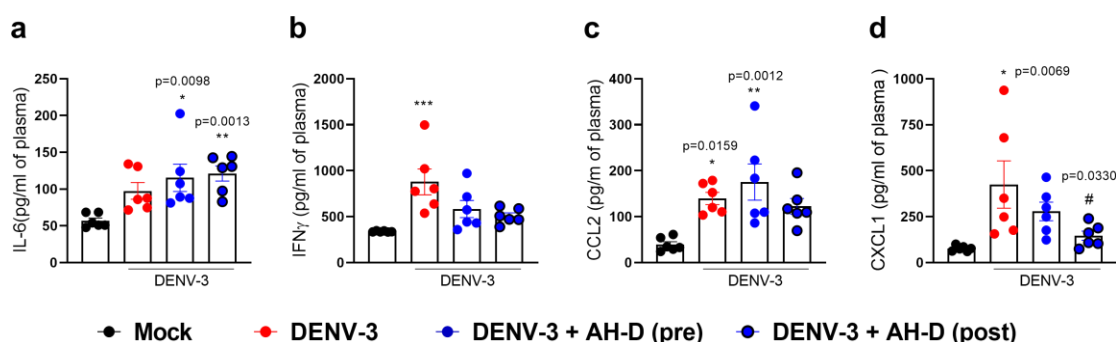


Figura 43- O tratamento com o peptídeo AH-D induziu alterações no perfil de citocinas/quimiocinas em animais infectados pelo DENV-3. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e tratados com 25 mg/kg do peptídeo AH-D, por via intravenosa, diariamente do início ao fim do experimento (n=6 para todos os grupos). **(a-b)** Dosagem das citocinas IL-6 e IFN- γ no plasma expressa em pg/mL. **(c-d)** Dosagem das quimiocinas CCL2 e CXCL-1 no plasma expressa em pg/mL. Os resultados foram expressos utilizando média + erro padrão da média. Em **a** e **b** foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Em **c** e **d** foi aplicado o teste One-way ANOVA. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. As diferenças encontradas em relação ao grupo DENV-3 (veículo) foram expressas com o uso do símbolo cerquilha “#”. Os valores de p foram especificados na figura.

A lesão hepática é uma das características marcantes da dengue (GUZMAN et al., 2010; SIMMONS et al., 2012). Diante disso, avaliamos o impacto do tratamento com o peptídeo AH-D na lesão desenvolvida no fígado dos camundongos infectados, através da análise histopatológica no 5º dia após a infecção, quando a lesão

observada foi mais intensa na caracterização do modelo. Nossas análises demonstraram que o infiltrado inflamatório (Figura 44 a) foi significativamente menor no fígado dos animais submetidos ao tratamento, especialmente nos animais tratados a partir do dia da infecção, quando comparados ao grupo veículo.

VIII. O tratamento com o peptídeo AH-D foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório no fígado no 5º dia após a infecção

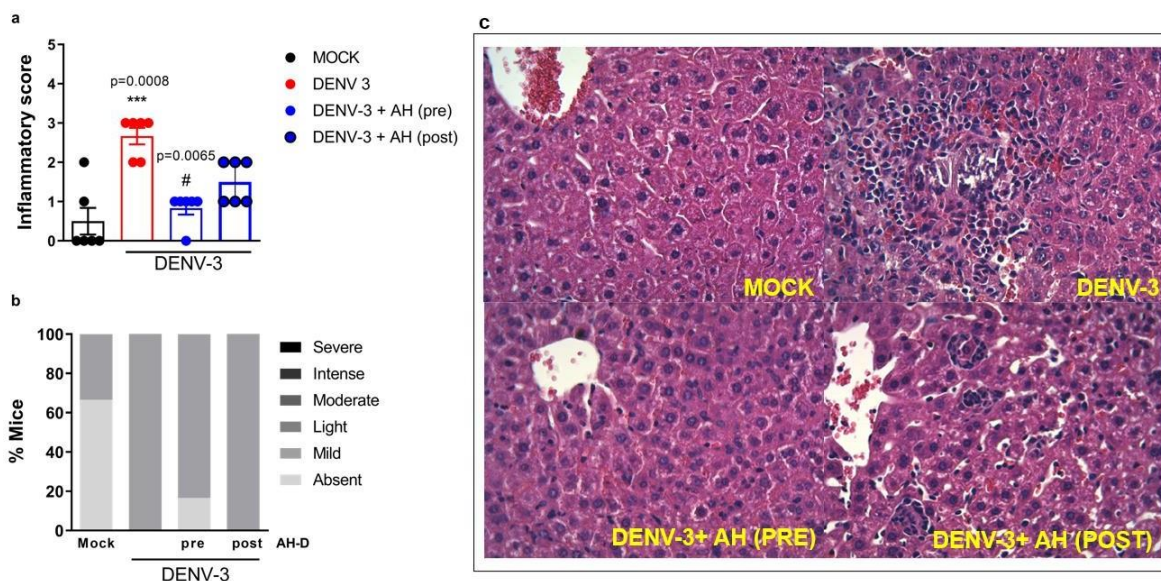


Figura 44- Animais infectados submetidos ao tratamento apresentaram redução do infiltrado inflamatório quando comparados ao grupo veículo. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e tratados com 25 mg/kg do peptídeo AH-D, por via intravenosa, diariamente do início ao fim do experimento (n=6 para todos os grupos) **(a)** Quantificação do infiltrado inflamatório no fígado. **(b)** Percentual de camundongos de acordo com o grau de infiltrado inflamatório no fígado. **(c)** Coloração H&E representativas de **a**, mostrando o infiltrado inflamatório no fígado de animais infectados, submetidos ou não ao tratamento. Os resultados **a** e **b** foram expressos por média + erro padrão da média. Em **a** foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. As diferenças encontradas em relação ao grupo DENV-3 foram expressas com o uso do símbolo cerquilha “#”. Os valores de p foram especificados na figura.

VI. DISCUSSÃO

Dentre as arboviroses já descritas, a dengue possui maior incidência e percentual de óbitos (SVS, 2020). Assim como sua prevalência se associa a um conjunto de fatores como a expansão do mosquito vetor, a falta de uma vacina eficaz contra todos os sorotipos e a carência de tratamento específico (seja voltado para o controle dos sinais e sintomas no hospedeiro ou para o combate ao vírus), seu enfrentamento deve contar com diferentes estratégias que busquem reverter os fatores que favorecem sua incidência.

Nossos resultados demonstram que- 1) O peptídeo AH-D apresenta atividade antiviral de amplo espectro contra diversos arbovírus, incluindo *Flavivirus* e *Alphavirus* e reduz a morte celular frente a infecção por esses vírus *in vitro*; 2) A dose de uso do peptídeo não apresenta toxicidade *in vivo*; 3) Camundongos infectados submetidos ao tratamento são protegidos da plaquetopenia e letalidade induzidas pelo DENV; 4) O tratamento antecipa alterações imunoinflamatórias, favorecendo o início do processo de resolução da inflamação. Estes achados sugerem que a administração do peptídeo AH-D pode representar uma estratégia terapêutica, independente da redução da carga viral nos alvos sistêmicos do DENV.

O reposicionamento de fármacos tem se mostrado uma excelente alternativa na busca por terapias para diversas doenças, incluindo a dengue (LOW et al., 2018). No presente trabalho, pudemos observar o potencial antiviral do peptídeo contra diferentes arbovírus *in vitro*, o que pode justificar sua aplicação em regiões endêmicas futuramente.

A viremia observada na infecção pelo DENV está associada com o envolvimento de diferentes órgãos nas formas mais graves da doença, sendo o fígado o órgão mais afetado (SAMANTA & SHARMA, 2015). Aqui, tratamento não resultou na diminuição da carga viral no baço em camundongos infectados pelo DENV, como demonstrado por Jackman e colaboradores (2018) em camundongos infectados pelo ZIKV. Porém, a carga viral no cérebro foi igualmente reduzida. O neurotropismo do DENV em camundongos, mesmo quando infectados por vírus não adaptados ao cérebro e / ou por uma via extraneural, é interessante. No entanto, outros membros da família *Flaviviridae*, são neurotrópicos e causam encefalite em humanos (YAUSH & SHRESTA, 2008). Como o DENV possui diversos alvos no organismo hospedeiro, seria pertinente um antiviral capaz de reduzir as cargas virais em seus diversos alvos

(JACKMAN, J.A., COSTA, V.V., PARK, S. *et al.* 2018), porém nos casos onde houver o acometimento do SNC a administração do peptídeo pode ser benéfica. Ainda são necessários estudos que sustentem essa alternativa.

A plaquetopenia induzida pelo DENV, demonstrada no modelo de infecção implementado pode ocorrer por mecanismos variados, dentre os quais estão- a) lise das plaquetas pelo sistema complemento e pelo envolvimento de anticorpos anti-plaquetas; b) destruição de plaquetas pelo aumento de apoptose; c) aumento no consumo de plaquetas devido à coagulação intravascular disseminada (NAKAO *et al.*, 1989; HOTTZ *et al.*, 2013). Chao e colaboradores (2019) demonstraram que a ativação plaquetária pela interação da proteína NS1 do DENV com TLR-4 promoveu um aumento de sua adesão ao endotélio e fagocitose por macrófagos, levando a plaquetopenia e hemorragia. Neste trabalho observamos que o tratamento foi capaz de impedir a plaquetopenia induzida pelo DENV, embora a carga viral sistêmica não tenha sido afetada. A literatura descreve uma ampla gama de efeitos fisiológicos dos peptídeos, devido a sua ação em um número significativo de receptores que afetam diversas vias metabólicas (DERGUNOVA *et al.*, 2020), o que pode justificar o impacto do tratamento na quantidade de plaquetas circulantes.

O estudo das alterações no transcriptoma sob a ação de drogas peptídicas demonstra claramente seus efeitos variados em várias vias do metabolismo celular (DERGUNOVA *et al.*, 2020). Dessa forma, são necessários estudos adicionais para avaliar alterações genéticas induzidas pela administração do peptídeo. Dados preliminares da análise transcriptômica de camundongos submetidos ao tratamento com AH-D demonstraram que ocorre uma inibição de genes associados a ativação plaquetária e a coagulação nesses animais, como os genes *Fgg*, *Fgb* e *Fga* (que codificam para plasminogênio), *Ambp* (associado a degradação de plasmina), *Plg* (plasmina) e *F2* (trombina). Estes achados sugerem o mecanismo pelo qual os animais tratados não apresentaram plaquetopenia, porém é indispensável que as análises sejam aprofundadas.

Manifestações hepáticas são tanto resultado da toxicidade viral direta quanto do dano pela exacerbação da resposta imunológica desencadeada em resposta ao vírus (SAMANTA & SHARMA, 2015). Nossos resultados demonstraram um intenso recrutamento de leucócitos para o fígado de animais infectados, o que se intensificou em animais tratados no 3º dia após a infecção. Porém, embora a literatura associe a

presença dessas células com a intensidade da lesão tecidual, animais que receberam o tratamento (com maior presença de infiltrado) apresentaram lesões mais brandas, quando comparados ao grupo não-tratado nas análises histopatológicas realizadas no 5º dia após a infecção. Estes resultados, em conjunto com os dados de dosagem de mediadores inflamatórios, sugerem que o peptídeo está, de alguma forma, modulando a inflamação benéficamente.

Sabe-se que a inflamação excessiva durante a dengue contribui para a patogênese da doença grave (COSTA et al., 2013). Diversos trabalhos suportam esses achados e demonstram que altos níveis de mediadores inflamatórios contribuem para o agravamento do quadro de pacientes com dengue, levando ao comprometimento hepático, hipotensão, trombocitopenia e choque hemorrágico (CHEN et al., 2006). Esses mediadores são proteínas secretadas durante a resposta imune desencadeada pela infecção (MARTY et al., 2006) e possuem papel central na patogênese da dengue grave (BOZZA et al., 2008).

Níveis aumentados de determinadas citocinas e quimiocinas, incluindo IL-6, CCL2, CCL5, CXCL1, TNF- α e IFN- γ já foram identificados como marcadores de infecção pelo DENV em humanos (SRIKIATKHACHORN & GREEN, 2010; ROTHMAN, 2011). Os leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos são células importantes para o combate e eliminação do DENV (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2005) e a migração dessas células para o local da infecção depende de sua habilidade de se moverem por um amplo gradiente de estímulos, em particular citocinas e quimiocinas (GHIGO et al., 2010).

Aqui, o tratamento foi capaz de impedir o aumento da citocina IFN- γ e da quimiocina CXCL1 importantes para o recrutamento de macrófagos e neutrófilos respectivamente. A redução de CXCL1 foi semelhante ao que foi demonstrado em animais infectados com ZIKV e submetidos ao tratamento. Em contrapartida houve um aumento de CCL2, com conhecida propriedade de atração de células mielóides e linfóides (GSCHWANDTNER, DERLER & MIDWOOD, 2019) e de IL-6 que atua fortemente nas reações inflamatórias, reafirmando o aumento da enzima mieloperoxidase no fígado e no baço demonstrados nos resultados. Interessantemente esse aumento só foi observado no 5º dia após a infecção em animais não submetidos ao tratamento

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há um forte interesse em desenvolver antivirais de amplo espectro que possam atenuar surtos virais emergentes e a membrana do envelope viral pode ser um alvo promissor, uma vez que os vírus envelopados são responsáveis por uma grande fração de epidemias e pandemias recentes. Com este objetivo, peptídeos antivirais como o AH-D com seletividade de membrana têm se mostrado úteis para desenvolver estratégias antivirais de amplo espectro através do rompimento da membrana. Em contrapartida, é preciso ampliar o olhar para que aspectos importantes não sejam desconsiderados, descobertos ou até mesmo ofuscados diante de resultados que divergem do esperado ou desejado.

VIII. PERSPECTIVAS

- I) Avaliar a permeabilidade vascular de animais infectados submetidos ao tratamento com o peptídeo AH-D
- II) Implementar modelos de infecção pelos outros sorotipos do DENV (DENV-1 e DENV-4) em camundongos A129 e avaliar a atividade do peptídeo nestes modelos.
- III) Identificar os mecanismos que envolvem a administração do peptídeo com o impedimento da plaquetopenia induzida pelo DENV.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em- <<http://portal.anvisa.gov.br/web/guest/noticias>> Acesso em agosto de 2020.

Alexander, N. et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. **Tropical Med. Int. Health** 16, 936–948, 2011.

Anup Vattia, Diana M. Monsalveb, Yovana Pachecob, Christopher Changaa, Juan.Manuel Anayab, M. Eric Gershwin. Original antigenic sin- A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity** 83, 12.21, 2017.

Avirutnan P, et al. Complement-mediated neutralization of dengue virus requires mannose-binding lectin. **MBio**. 2011;2-e00276–00211.

Becerra, A. et al. Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. **J. Med. Virol.** 81, 1403–1411, 2009.

Badani, H., Garry, R. F. & Wimley, W. C. Peptide entry inhibitors of enveloped viruses- the importance of interfacial hydrophobicity. **Biochim. Biophys. Acta Biomembr.** 1838, 2180–2197, 2014.

Back A.T., Lundkvist A. Dengue viruses - An overview. **Infect. Ecol. Epidemiol.** 2013.

Balsitis, S.J.; Coloma, J.; Castro, G.; Alava, A.; Flores, D.; McKerrow, J.H.; Beatty, P.R.; Harris, E. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-Specific immunostaining. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2009, 80, 416–424.

Balsitis SJ, Harris E. Animal models of dengue virus infection- applications, insights, and frontiers. In- Hanley KA, Weaver SC, eds. *Frontiers in dengue virus research*. Norwich, **Horizon Scientific Press**, 2009 (in press).

Begum, F.; Das, S.; Mukherjee, D.; Mal, S.; Ray, U. Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. **Viruses** 2019, 11, 1136.

Brady, O. J. et al. Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. **Parasit. Vectors** 7, 338, 2014.

Brass, V., E. Bieck, R. Montserret, B. Wolk, J. A. Hellings, H. E. Blum, F. Penin, and D. Moradpour. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **J. Biol. Chem.** 277-8130–8139, 2002.

Boo KH, Yang JS. Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon. **Yonsei Med J** 51(1)-9–17, 2010.

Buttinelli G, Donati V, Fiore S, et al. Nucleotide variation in Sabin type 2 poliovirus from an immunodeficient patient with poliomyelitis. **J Gen Virol.** 2003;84-1215–1221.

Cantatore A, Randall SD, Traum D, Adams SD. Effect of black tea extract on herpes simplex virus-1 infection of cultured cells. **BMC Compl Altern Med.** 2013;13-1–10.

Carrillo-Hernandez, M. Y., Ruiz-Saenz, J., Villamizar, L. J., Gomez-Rangel, S. Y., and Martínez-Gutierrez, M. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. **BMC Infect. Dis.** 18, 61, 2018.

Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em- <<https://www.cdc.gov/dengue/symptoms/index.html>> Acesso em agosto de 2020.

Chaterji S, Allen JC Jr, Chow A, Leo YS, Ooi EE. Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. **Am J Trop Med Hyg,** 84-224-228, 2011.

Chambers, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication, **Annu Rev Microbiol.**, v. 44, p. 649-688, 1990.

Chen YL, Abdul Ghafar N, Karuna R, Fu Y, Lim SP, Schul W, Gu F, Herve M, Yokohama F, Wang G, Cerny D, Fink K, Blasco F, Shi PY (2014) Activation of peripheral blood mononuclear cells by dengue virus infection depotentiates balapiravir. **J Virol** 88(3)-1740–1747.

Chen N, Zhou M, Dong X. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China- a descriptive study. **Lancet.** 2020;395-507–513.

Cho NJ, Jackman JA, Liu M, Frank CW. pH-driven assembly of various supported lipid platforms- a comparative study on silicon oxide and titanium oxide. **Langmuir.** 2011

Cho, N.J., Wang, G., Edvardsson, M., Glenn, J. S., Hook, F., & Frank, C. W. Alpha-Helical Peptide-Induced Vesicle Rupture Revealing New Insight into the Vesicle Fusion Process As Monitored in Situ by Quartz Crystal Microbalance-Dissipation and Reflectometry. **Analytical Chemistry,** 81(12), 4752–4761, 2009.

Clyde K., Kyle J. L., Harris E., Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology,** v. 80, p. 11418-11431, 2006.

Costa, Vivian V. Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection. **The American Journal of Pathology**, Vol. 182, No. 6, June 2013.

Costa, V. V. et al. Dengue virus-infected dendritic cells, but not monocytes, activate natural killer cells through a contact-dependent mechanism involving adhesion molecules. **mBio**, v. 8, n. 4, e00741-17, 2017.

Cruz.Oliveira, C et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, p. 155.170, 2015.

Cui, L. et al. Serum metabolomics reveals serotonin as a predictor of severe dengue in the early phase of dengue fever. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 10, e0004607, 2016.

Da ZhuJ, Meng W, Wang XJ, Wang HCR. Broad-spectrum antiviral agents. **Front Microbiol.** 2015;6-1–15.

Deming P, McNicholl IR. Coinfection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus- challenges and therapeutic advances—insights from the society of infectious diseases pharmacists. **Pharmacotherapy.** 2011;4-357–368.

Dergunova, L. V., Filippenkov, I. B., Limborska, S. A., & Myasoedov, N. F. Pharmacotranscriptomics of peptide drugs with neuroprotective properties. **Medicinal Research Reviews**, 2020

De Souza WV, De Albuquerque MDFPM, Vazquez E, et al. Microcephaly epidemic related to the Zika virus and living conditions in Recife, Northeast Brazil. **BMC Public Health.** 2018;18-1–7.

Dong, H.; Chang, D.C.; Xie, X.; Toh, Y.X.; Chung, K.Y.; Zou, G.; Lescar, J.; Lim, S.P.; Shi, P.Y. Biochemical and genetic characterization of dengue virus methyltransferase. **Virology** 2010, 405, 568–578.

Dong, S., & Dimopoulos, G. (2021). *Antiviral Compounds for Blocking Arboviral Transmission in Mosquitoes.* **Viruses**, 13(1), 108.

Duraffour S, Andrei G, Topalis D, et al. Mutations conferring resistance to viral DNA polymerase inhibitors in camelpox virus give different drug-susceptibility profiles in vaccinia virus. **J Virol.** 2012;86-7310–7325.

Durbin, A.P.; Vargas, M.J.; Wanionek, K.; Hammond, S.N.; Gordon, A.; Rocha, C.; Balmaseda, A.; Harris, E. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. **Virology** 2008, 376, 429–435

Dussart P, Petit L, Labeau B, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. **PLoS Negl Trop Dis**, 2-e280-e280, 2008.

Elazar, M., K. H. Cheong, P. Liu, H. B. Greenberg, C. M. Rice, and J. S. Glenn. Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. **J. Virol.** 77-6055–6061, 2003.

El Raziky M, Fathalah WF, El-Akel WA, et al. The effect of peginterferon Alpha-2a vs. Peginterferon Alpha-2b in treatment of naive chronic HCV genotype-4 patients- a single centre Egyptian study. **Hepat Mon.** 2013;13-10069

Elion GB. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. **Am J Med.** 1982;73-7–13.

Elshabrawy HA, Fan J, Haddad CS, et al. Identification of a broad-spectrum antiviral small molecule against severe acute respiratory syndrome coronavirus and ebola, hendra, and nipah viruses by using a novel high-throughput screening assay. **J Virol.** 2014;88-4353–4365.

Eyre, N.S.; Kirby, E.N.; Anfiteatro, D.R.; Bracho, G.; Russo, A.G.; White, P.A.; Aloia, A.L.; Beard, M.R. Identification of Estrogen Receptor Modulators as inhibitors of Flavivirus Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020, 64.

Fagundes, C. T. et al. IFN.γ Production depends on IL-12 and IL-18 Combined Action and Mediates Host Resistance to Dengue Virus Infection in a Nitric Oxide-Dependent Manner. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, i. 12, e1449, 2011.

Fagundes C.T., Costa V.V., Cisalpino D., Souza D.G. Teixeira M.M. Therapeutic opportunities in dengue infection. **Drug Devel Res.** vol. 72, p. 480-500, 2011.

Farias KJS, Machado PRL, Muniz JAPC, Imbeloni AA, da Fonseca BAL (2015) Antiviral activity of chloroquine against dengue virus type 2 replication in Aotus monkeys. *Viral Immunol* 28(3)-161–169.

Fching Lin, Young HA. Interferons- Success in anti-viral immunotherapy. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2014;25-369–376.

Fink, J. et al. Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. **Ver Med Virol.**, n. 16, v. 4, p. 263-275, 2006.

Fiocruz. Dengue. Disponível em- <<http://www.agencia.fiocruz.br/dengue.0>>. Acesso em setembro de 2019.

Fry SR, Meyer M, Semple MG, et al. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. **PLoS Negl Trop Dis**, 5-e1199-e1199, 2011.

Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin-complement pathway—its role in innate immunity and evolution. **Immunol. Rev.** 2004; 198-185–202.

Furuta T, Murao LA, Lan NTP, Huy NT, Huong VTQ, Thuy TT, Tham VD, Nga CTP, Ha TTN, Ohmoto Y, Kikuchi M, Morita K, Yasunami M, Hirayama K, Watanabe N

(2012) Association of mast cell-derived VEGF and proteases in dengue shock syndrome. **PLoS Negl Trop Dis** 6(2).

Gasperi A, Mazza E, Prosperi M. Indocyanine green kinetics to assess liver function-Ready for a clinical dynamic assessment in major liver surgery? **World J Hepatol**, vol 8(7), p. 355-367, 2016.

Goncalvez AP et al. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2007, 104-9422–9427.

Green AM, Beatty PR, Hadjilaou A, Harris E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **Journal of Molecular Biology**. 426(6)-1148-1160, 2014.

Gschwandtner Martha, Derler Rupert, Midwood Kim S. More Than Just Attractive- How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Frontiers in Immunology*, vol. 10, pag. 2759; 2019.

Gubler, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Ver.**, v.11, p.480-496, 1998.

Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **PLoS Negl Trop Dis** 2010;4-e811-e811

Guzman Maria G, Eva Harris. Dengue. **The Lancet**, Volume 385, Issue 9966, Pages 453.465, 2015.

Guzman, Maria G. Dengue infection. **Nature reviews | Disease primers**, Vol. 2, August 2016.

Harapan H, Michie A, Sasmono RT, Imrie A. Dengue- A Minireview. **Viruses**. vol 12(8)-829, 2020.

Hancock, R. E., and Sahl, H.-G. Antimicrobial and hostdefense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat. Biotechnol.** 24, 1551–1557, 2006.

Hijikata, M., H. Mizushima, Y. Tanji, Y. Komoda, Y. Hirowatari, T. Akagi, N. Kato, K. Kimura, and K. Shimotohno. Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90-10773–10777, 1993.

Hoang, L.T. et al. The early whole-blood transcriptional signature of dengue virus and features associated with progression to dengue shock syndrome in Vietnamese children and young adults. **J. Virol.** 84, 12982–12994, 2010.

Hottz, E. D. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, n. 5, p. 951-962, 2013

Hui DSC, Lee N, Chan PKS. A clinical approach to the threat of emerging influenza viruses in the Asia–Pacific region. **Respirology**. 2017;22-1300–1312.

Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, et al. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. **Emerg Infect Dis** ,15-436-440, 2009.

Jackman, J.A., Costa, V.V., Park, S. *et al.* Therapeutic treatment of Zika virus infection using a brain-penetrating antiviral peptide. **Nature Mater** vol.17, p. 971–977, 2018.

Jessie, K.; Fong, M.Y.; Devi, S.; Lam, S.K.; Wong, K.T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **J. Infect. Dis.** **2004**, *189*, 1411–1418.

Jesus T, Rogelio L, Abraham C, et al. Prediction of antiviral peptides derived from viral fusion proteins potentially active against herpes simplex and influenza A viruses. **Bioinformatics**. 2012;8-870–874.

Kanai, R. et al. Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. **J. Virol.** 80, 11000–11008, 2006.

Kangwanpong, D.; Bhamarapravati, N.; Lucia, H.L. Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the in situ PCR method- A case report. **Clin. Diagn. Virol.** **1995**, *3*, 165–172.

Kao, Yu-Ting & Lai, Michael & Yu, Chia-Yi. How Dengue Virus Circumvents Innate Immunity. **Frontiers in Immunology**. 9, 2018.02860.

Kato, F.; Nio, Y.; Yagasaki, K.; Suzuki, R.; Hijikata, M.; Miura, T.; Miyazaki, I.; Tajima, S.; Lim, C.K.; Saijo, M.; et al. Identification of inhibitors of dengue viral replication using replicon cells expressing secretory luciferase. **Antivir. Res.** 2019, *172*, 104643.

Katzelnick, L.C. et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science** 358, 929–932, 2017.

Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann M.G., Pletnev S.V., Corver J., Lenches E., Jones C.T., Mukhopadhyay S., Chipman P.R., Strauss E.G., et al. Structure of Dengue Virus- Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. **Cell**. 108-717–725, 2002.

Kyle, J.L.; Beatty, P.R.; Harris, E. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. **J. Infect. Dis.** 2007, *195*, 1808–1817.

Lee KG, Xu S, Kang ZH, Huo J, Huang M, Liu D, et al. Bruton's tyrosine kinase phosphorylates Toll-like receptor 3 to initiate antiviral response. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 109-5791–6, 2012.

Le Page AK, Jager MM, Iwasenko JM, et al. Clinical aspects of cytomegalovirus antiviral resistance in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2013;56-1018–1029.

Lo YC, Perng GC. Novel concept on antiviral strategies to dengue. *Curr Opin Virol*. vol.18, p.97-108, 2016.

Long, H.T. et al. Patterns of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection. *J. Infect. Dis*. 199, 537–546, 2009.

Lou Z, Sun Y, Rao Z. Current progress in antiviral strategies. *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35-86–102.

Low, J. G., Gatsinga, R., Vasudevan, S. G., & Sampath, A. (2018). Dengue Antiviral Development- A Continuing Journey. *Dengue and Zika- Control and Antiviral Treatment Strategies*, 319–332.

Low JG, Sung C, Wijaya L, Wei Y, Rathore APS, Watanabe S, Tan BH, Toh L, Chua LT, Hou Y a, Chow A, Howe S, Chan WK, Tan KH, Chung JS, Cherng BP, Lye DC, Tambayah PA, Ng LC, Connolly J, Hibberd ML, Leo YS, Cheung YB, Ooi EE, Vasudevan SG (2014) Efficacy and safety of celgosivir in patients with dengue fever (CELADEN)- a phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial. *Lancet Infect Dis* 14(8)-706–715.

Lowe R, Barcellos C, Brasil P, et al. The zika virus epidemic in brazil- from discovery to future implications. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15-1–18.

Marston BJ, Dokubo EK, van Steelandt A, et al. Ebola response impact on public health programs, West Africa, 2014–2017. *Emerg Infect Dis*. 2017;23-S25–S32.

Martins FO, da Rocha Gomes MM, Pereira Nogueira FL, et al. In vitro inhibitory effect of *Urera baccifera* (L.) Gaudich. extracts against herpes simplex. *African J Pharm Pharmacol*. 2009;3-581–584.

Masyeni S, Santoso MS, Widyaningsih PD, et al. Serological cross-reaction and coinfection of dengue and COVID-19 in Asia- Experience from Indonesia. *Int J Infect Dis*. 2021;102-152-154.

Messina, J.P., Brady, O.J., Golding, N. et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat Microbiol* 4, 1508–1515, 2019.

Miagostovich, M.P.; Ramos, R.G.; Nicol, A.F.; Nogueira, R.M.; Cuzzi-Maya, T.; Oliveira, A.V.; Marchevsky, R.S.; Mesquita, R.P.; Schatzmayr, H.G. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin. Neuropathol*. 1997, 16, 204–208.

Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popovic, M., Poljs´ak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., and Fabjan Vodusek, V. Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med*. 374, 951–958, 2016.

Mordecai, E. A. et al. Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 11, e0005568, 2017.

Mota, T. M. O. et al. Mosquito transmitted viruses - the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47S, p.38-50, 2016.

Munoz-Jordan, J.L.; Sanchez-Burgos, G.G.; Laurent-Rolle, M.; Garcia-Sastre, A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2003, 100, 14333–14338.

Murphy, B. R; Whitehead, S. S. Immune response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. **Annu. Rev. Immunol.**, vol. 29, p. 587.619, 2011.

Musiime V, Kaudha E, Kayiwa J, et al. Antiretroviral drug resistance profiles and response to second-line therapy among HIV type 1-infected ugandan children. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2013;29-449–455.

Nakao, S. et al. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. **Blood**, vol. 74, n. 4, p. 1235-1240, 1989.

Nasirudeen AM, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam KP, Liu DX. RIG.I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. **PLoS Negl Trop Dis**. vol. 5-e926, 2011.

Navarro-Sanchez, E. et al., Innate immune responses to dengue virus. **Arch Med Res.**, v. 36, n. 5, p. 425-435, 2005.

Ngono & Shresta. Immune Response to Dengue and Zika. **Annu. Rev. Immunol.** 36-10.1–10.30, 2018.

Nguyen NM, Tran CN, Phung LK, Duong KT, Huynh Hle A, Farrar J, Nguyen QT, Tran HT, Nguyen CV, Merson L, Hoang LT, Hibberd ML, Aw PP, Wilm A, Nagarajan N, Nguyen DT, Pham MP, Nguyen TT, Javanbakht H, Klumpp K, Hammond J, Petric R, Wolbers M, Nguyen CT, Simmons CP. A randomized, double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. **J Infect Dis** 207(9)-1442–1450, 2013.

Nobuchi, H. The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia. **Kanpo Rinsho**, v.26, p. 422-425, 1979.

Nogueira, M. L. et al Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Rev Panam Sal Públ.**, v.22, p.358-363, 2007.

Noisakran, S.; Onlamoon, N.; Songprakhon, P.; Hsiao, H.M.; Chokephaibulkit, K.; Perng, G.C. Cells in dengue virus infection in vivo. **Adv. Virol.** 2010, 2010, 1–15

Organizacao Mundial da Saude. Disponível em- < <https://www.who.int/health.topics/dengue.and.severe.dengue>>. Acesso em Agosto de 2020.

Perera R., Kuhn R.J. Structural proteomics of dengue virus. **Curr. Opin. Microbiol.** vol.11, p.369–377, 2008.

Pinheiro TM, Mota MTdO, Watanabe ASA, Biselli.Périco JM, Drumond BP, et al. Viral immunogenicity determines epidemiological fitness in a cohort of DENV.1 infection in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 12(5)- e0006525, 2018.

Popper, S.J. et al. Temporal dynamics of the transcriptional response to dengue virus infection in Nicaraguan children. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 6, e1966, 2012.

Póvoa, T.F.; Alves, A.M.B.; Oliveira, C.A.B.; Nuovo, G.J.; Chagas, V.L.A.; Paes, M.V. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases- Histopathology, ultrastructure and virus replication. **PLoS ONE**, 9, 1–16, 2014.

Prestwood, T.R.; May, M.M.; Plummer, E.M.; Morar, M.M.; Yauch, L.E.; Shresta, S. Trafficking and replication patterns reveal splenic macrophages as major targets of dengue virus in mice. **J. Virol.** 2012, 86, 12138–12147.

Rathore AP, Mantri CK, Aman SA, et al. Dengue virus-elicited tryptase induces endothelial permeability and shock. **J Clin Invest.** 129(10)-4180.4193, 2019.

Radi, M. Drug repurposing approaches to fight Dengue virus infection and related diseases. *Frontiers in Bioscience*, 23(3), 997–1019, 2018.

Robinson, M., & Einav, S. Towards Predicting Progression to Severe Dengue. **Trends in Microbiology**, 2020.

Rodriguez-Madoz, J.R.; Belicha-Villanueva, A.; Bernal-Rubio, D.; Ashour, J.; Ayllon, J.; Fernandez-Sesma, A. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. **J. Virol.** 2010, 84, 9760–9774.

Rodriguez-Madoz, J.R.; Bernal-Rubio, D.; Kaminski, D.; Boyd, K.; Fernandez-Sesma, A. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. **J. Virol.** 2010, 84, 4845–4850.

Rothman A.L. Immunity to dengue virus- a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat Rev Immunol.** vol.11, p. 532.543, 2011.

Rothan HA, Bahrani H, Rahman NA, Yusof R. Identification of natural antimicrobial agents to treat dengue infection- in vitro analysis of laticin peptide activity against dengue virus. **BMC Microbiol.** 2014;14-1–10.

Sariol CA, Martinez MI, Rivera F, Rodriguez IV, Pantoja P, Abel K, et al. Decreased dengue replication and an increased anti.viral humoral response with the use of combined Toll.like receptor 3 and 7/8 agonists in macaques. **PLoS One.** 6- e19323, 2011.

Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casadémont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste.Rudnitski A, Kalayanarooj SM, Tangnararatchakit K, Tangthawornchaikul N, Vasanawathana S, Chaiyaratana W, Yenchitsomanus PT, Suriyaphol P, Avirutnan P, Chokephaibulkit K, Matsuda F, Yoksan S, Jacob Y, Lathrop GM, Malasit P, Després

P, Julier C. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nat Genet.** 37(5)-507.13, 2005.

Salje, H. et al. Reconstruction of antibody dynamics and infection histories to evaluate dengue risk. **Nature** 557, 719–723, 2018.

Samanen, J. Similarities and differences in the discovery and use of biopharmaceuticals and small-molecule chemotherapeutics. **Introd. Biol. Small Mol. Drug Res. Dev. Theory Case Stud.** 2013, 161–203

Samanta J, Sharma V. Dengue and its effects on liver. **World J Clin Cases**, v.2, p. 125-131, 2015

Selby, M. J., Q..L. Choo, K. Berger, G. Kuo, E. Glazer, M. Eckart, C. Lee, D. Chien, C. Kuo, and M. Houghton. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. **J. Gen. Virol.** 74-1103–1113, 1993.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 46, 2021. Vol. 52. Nov. 2021 .

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.**, v. 78, p. 2701.2710, 2004.

Shan, C., Xie, X., Barrett, A. D., Garcia-Blanco, M. A., Tesh, R. B., Vasconcelos, P. F. d. C., Vasilakis, N., Weaver, S. C., and Shi, P.-Y. Zika virus- diagnosis, therapeutics, and vaccine. **ACS Infect. Dis.** 2, 170–172, 2016.

Sikka, V. et al. The emergence of Zika virus as a Global Health Security Threat- A Review and a Consensus Statement of the INDUSEM joint Working Group (JWG). **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 8.1, p. 3-15, 2016.

Silva LK, Blanton RE, Parrado AR, et al. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. **Eur J Hum Genet.** 18(11)-1221.1227, 2010.

Sim, S.; Hibberd, M. L. Genomic approaches for understanding dengue- insights from the virus, vector, and host. **Genome Biology** 17, 38 (2016).

Simons, C. P. et al. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis.**, v. 195, p. 1097-107, 2007.

Simmons, C. P. et al. Dengue. **N Engl J Med**, 366-1423-1432, 2012.

Simmons, C. P., Wolbers, M., Nguyen, M. N., Whitehorn, J., Shi, P. Y., Young, P., Petric, R., Farrar, J., and Wills, B. Therapeutics for dengue- recommendations for design and conduct of early-phase clinical trials. **PLoS Neglected Trop. Dis.** 6, e1752, 2012.

Srikiatkachorn, A. et al. Dengue – how best to classify it. **Clin. Infect. Dis.** 53, 563–567, 2011.

St. John AL. Influence of Mast Cells on Dengue Protective Immunity and Immune Pathology. **PLoS Pathog** 9(12)- e1003783, 2013.

Suijkerbuijk AWM, Swaan CM, Mangen M-JJ, et al. Ebola in the Netherlands, 2014–2015- costs of preparedness and response. **Eur J Heal Econ.** 2017;19-1–9.

Sun, P.; Kochel, T.J. The battle between infection and host immune responses of dengue virus and its implication in dengue disease pathogenesis. **Sci. World J.** 2013, 2013, 1–11.

Sun, P. et al. Sequential waves of gene expression in patients with clinically defined dengue illnesses reveal subtle disease phases and predict disease severity. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 7, e2298, 2013.[

Suppiah J, Ching SM, Amin-Nordin S, Mat-Nor LA, Ahmad-Najimudin NA, et al. (2018) Clinical manifestations of dengue in relation to dengue serotype and genotype in Malaysia- A retrospective observational study. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 12(9)- e0006817.

Tahir ul Qamar, M., Maryam, A., Muneer, I. *et al.* Computational screening of medicinal plant phytochemicals to discover potent pan.serotype inhibitors against dengue virus. **Sci Rep** 9, 1433, 2019.

Tam DT, Ngoc TV, Tien NT, Kieu NT, Thuy TT, Thanh LT, Tam CT, Truong NT, Dung NT, Qui PT, Hien TT, Farrar JJ, Simmons CP, Wolbers M, Wills BA (2012) Effects of short-course oral corticosteroid therapy in early dengue infection in Vietnamese patients- a randomized, placebo-controlled trial. **Clin Infect Dis** 55(9)-1216–1224.

Thiel S, et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature.** 1997; 386-506.

Thompson C, Whitley R. Neonatal herpes simplex virus infections- where are we now? **Adv Exp Med Biol.** 2011

Tricou V, Minh NN, Van TP, Lee SJ, Farrar J, Wills B, Tran HT, Simmons CP. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. **PLoS Negl Trop Dis** 4(8)-e785, 2010.

Tripathi NK and Shrivastava A. Recent developments in recombinant protein. based dengue vaccines. **Front. Immunol.** 9-1919, 2018.

Uno, Naoko & Ross, Ted. Dengue virus and the host innate immune response. **Emerging Microbes & Infections.** 7, 2018.

Urcuqui-Inchima, S. Cabrera, J. Haenni, A. Interplay between dengue virus and Toll-like receptors, RIG-I/MDA5 and microRNAs- Implications for pathogenesis, **Antiviral Research**, Volume 147, Pages 47-57, 2017.

van Cleef, K.W.R.; Overheul, G.J.; Thomassen, M.C.; Kaptein, S.J.F.; Davidson, A.D.; Jacobs, M.; Neyts, J.; van Kuppeveld, F.J.M.; van Rij, R.P. Identification of a new dengue virus inhibitor that targets the viral NS4B protein and restricts genomic RNA replication. **Antivir. Res.** 99, 165–171, 2013.

Vaughn, D. W., Green, S., Kalayanarooj, S., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T. P., Raengsakulrach, B., Rothman, A. L., and Ennis, F. A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J. Infect. Dis.** 181, 2–9, 2000.

Vigant, F., Santos, N. C., and Lee, B. Broad-spectrum antivirals against viral fusion. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 426–437, 2015.

Villar, L. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. **N Engl J Med.**, v. 372, p. 113.123, 2015.

Vilas Boas LCP, Campos ML, Berlanda RLA, de Carvalho Neves N, Franco OL. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. **Cell Mol Life Sci.** 76(18)-3525-3542, 2019.

Wahala, W.M.P.B.; De Silva, A.M. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. **Viruses**, 3, 2374-2395, 2011.

Wang G, Watson KM, Peterkofsky A, Buckheit RW. Identification of novel human immunodeficiency virus type 1-inhibitory peptides based on the antimicrobial peptide database. **Antimicrob Agents Chemother.** 2010;54-1343–1346.

Weaver S.C., Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses- Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infect. Genet. Evol.** 9-523–540, 2009.

Weaver, S.C.; Charlier, C.; Vasilakis, N.; Lecuit, M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annu. Rev. Med.** 69, 395–408, 2018.

Welsch, S., Miller, B., and Krausslich, H.-G. More than "one door-budding" enveloped viruses through cellular membranes. **FEBS Lett.** 581, 2089–2097, 2007.

World Health Organization. Handbook for Clinical Management of Dengue, **World Health Organization.** 2012.

Whitehorn J, Nguyen CVV, Khanh LP, Kien DTH, Quyen NTH, Tran NTT, Hang NT, Truong NT, Hue Tai LT, Cam Huong NT, Nhon VT, Van Tram T, Farrar J, Wolbers M, Simmons CP, Wills B. Lovastatin for the treatment of adult patients with dengue- a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clin Infect Dis** 62(4)-468–476, 2016

Yang, Y. et al. Dependency of vaccine efficacy on preexposure and age- a closer look at a tetravalent dengue vaccine. **Clin. Infect. Dis.** 66, 178–184, 2018.

Yan G, Lee CK, Lam LTM, et al. Covert COVID-19 and false-positive dengue serology

in Singapore. **Lancet Infect Dis.** 2020;20(5)-536. doi-10.1016/S1473-3099(20)30158-4.

Yauch, Lauren E, and Sujun Shresta. "Mouse models of dengue virus infection and disease." **Antiviral research** vol. 80,2 - 87-93, 2008.

Ye, J. et al. Japanese Encephalitis Virus NS5 Inhibits Type I Interferon (IFN) Production by Blocking the Nuclear Translocation of IFN Regulatory Factor 3 and NF.Kb. **J. Virology**, v. 91, n. 8, e00039.17, 2017.

Yoon, B. K., Jeon, W.-Y., Sut, T. N., Cho, N.-J., & Jackman, J. A. Stopping Membrane-Enveloped Viruses with Nanotechnology Strategies- Toward Antiviral Drug Development and Pandemic Preparedness. **ACS Nano.** 2020.

Yoneyama, M. Fujita, T. Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. **J. Biol. Chem.**, 282, pp. 15315-15318, 2007.

Zhang, Y. et al. Conformational changes of the flavivirus e glycoprotein. **Structure** 12, 1607–1618, 2004.

Zinzula L, Tramontano E. Strategies of highly pathogenic RNA viruses to block dsRNA detection by RIG.I.like receptors- hide, mask, hit. **Antiviral Res.** 100-615–35, 2013.

Zompi S. Harris E. Animal models of dengue virus infection. **Viruses.** 4- 62.82, 2012.

Zust R, Cervantes.Barragan L, Habjan M, Maier R, Neuman BW, Ziebuhr J, et al. Ribose 2. O. methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non.self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. **Nat Immunol.** 12-137–43, 2011.

ANEXO I

CEUA aprovado para a realização dos experimentos em animais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 234/2019
Título do projeto: IMPLEMENTAÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFECÇÃO EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES NO RECEPTOR DE INTERFERON α/β (A1.29-/-) PELO DENGUE VIRUS PARA AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICOS
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Vivian Vasconcelos Costa
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Morfologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 30/09/2019. Validade: 30/09/2019 à 29/09/2024.

Belo Horizonte, 30/09/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@pmpo.ufmg.br

ANEXO II

Implementação de modelo de infecção pelo DENV-2 em camundongos A129.

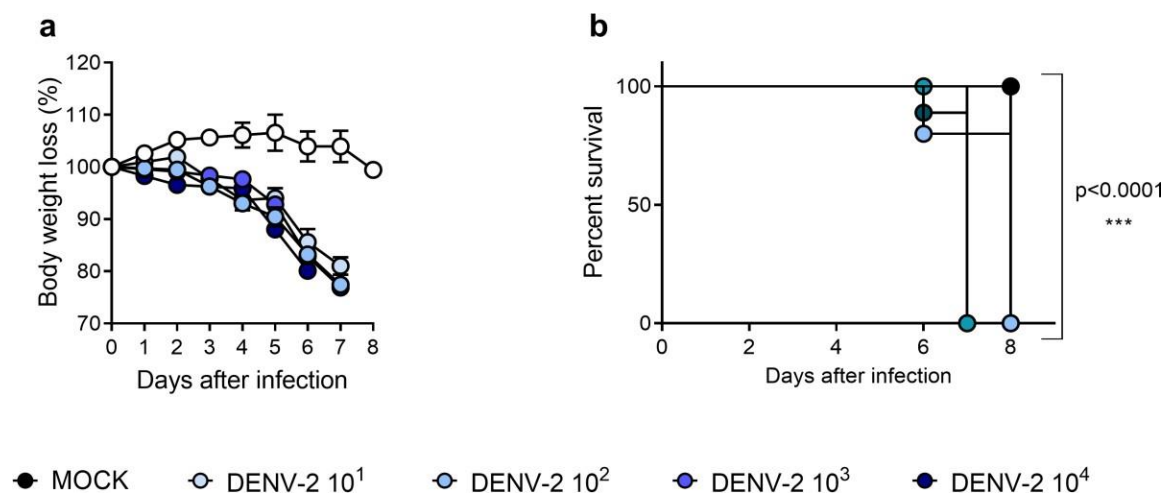


Figura 1- A infecção de camundongos A129 pelo DENV-2 leva a morbimortalidade em todos os inóculos administrados. Camundongos A129 foram infectados com diferentes inóculos do DENV-2, a saber- 2×10^1 , 2×10^2 , 2×10^3 e 2×10^4 PFU e acompanhados diariamente até sucumbir a infecção ou atingir perda de massa corporal superior a 20% da massa inicial (n=5 para Mock; n=6 para cada um dos demais grupos). **(a)** Avaliação da massa corporal diária expressa em % de perda. **(b)** Avaliação diária da curva de sobrevivência. Ambos os resultados foram expressos em média + erro padrão da média. Em **a** foi aplicado o teste One-way ANOVA por dia. Em **b** foi aplicado o teste de log-rank (Mantel-Cox). As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock, foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. Os valores de p foram especificados na figura.

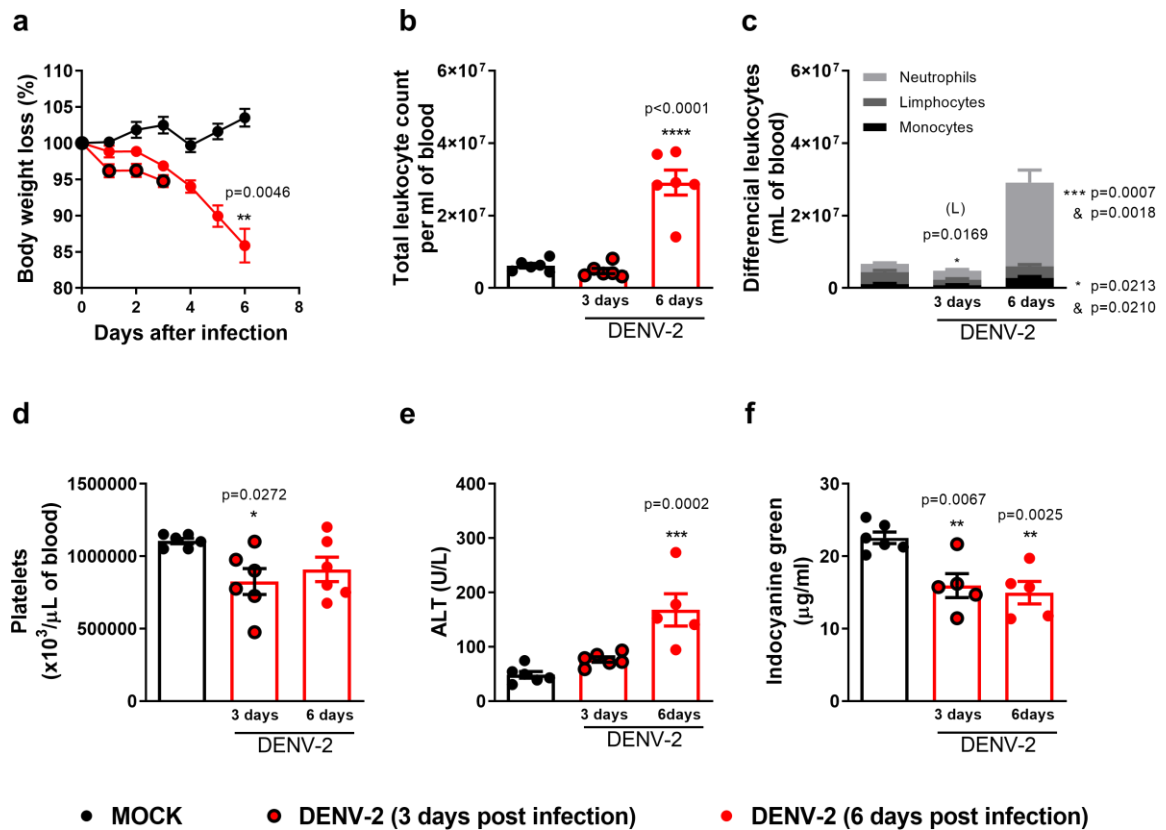


Figura 2- A infecção pelo DENV-2 em camundongos A129 induz perda de massa corporal, plaquetopenia, lesão hepática e leucocitose. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^2 PFU do DENV-2, e eutanasiados ao 3º e 6º dia após a infecção para análise de carga viral e alterações imunoinflamatórias ($n=6$ para todos demais grupos). **(a)** Avaliação da massa corporal diária expressa em % de perda. **(b)** Contagem de leucócitos totais no sangue expressa por mL. **(c)** Contagem de leucócitos diferenciais no sangue expressa por mL. **(d)** Contagem de plaquetas circulantes no sangue expressa por μL . **(e)** Dosagem da enzima ALT no plasma expressa em U/L para teste de lesão hepática. **(f)** Dosagem de verde indocianina no plasma expressa em $\mu\text{g/ml}$ para teste de função hepática. Ambos os resultados foram expressos em média + erro padrão da média. Em **c** foi aplicado teste Two-way ANOVA. Em todos os demais gráficos deste painel foi aplicado o teste One-way ANOVA. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. As diferenças encontradas entre os grupos DENV-2 foram expressas com o uso do símbolo ampersand “&”. Os valores de p foram especificados na figura.

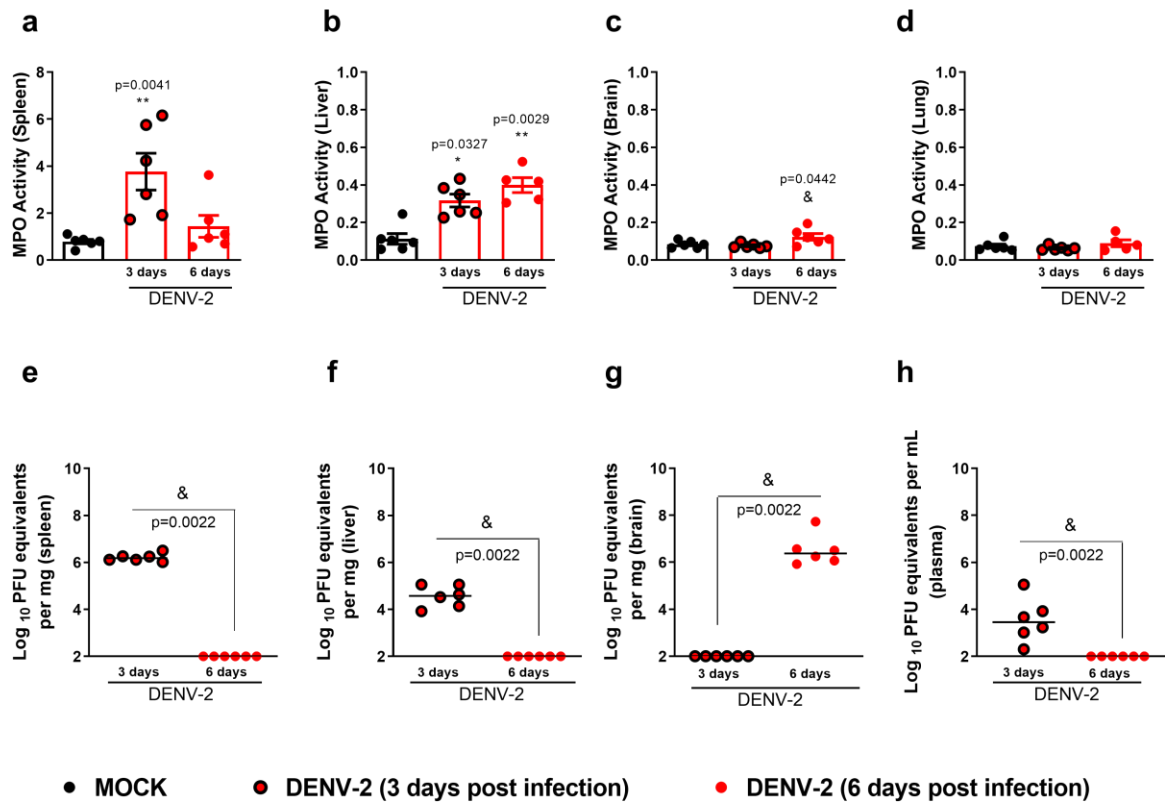


Figura 3- Animais infectados pelo DENV apresentaram recrutamento de neutrófilos para os tecidos e viremia. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^2 PFU do DENV-2, e eutanasiados ao 3º e 6º dia após a infecção para análise de carga viral e alterações imunoinflamatórias (n=6 para todos os grupos). **(a-d)** Dosagem da enzima mieloperoxidase no baço, fígado, cérebro e pulmão, respectivamente (média + erro padrão da média). **(e-h)** Carga viral viável expressa em PFU/mg de tecido ou PFU/mL de plasma (mediana). Em **a, b e d** foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Em **c** foi aplicado o teste One-way ANOVA. Por fim, em **e, f, g e h** foi aplicado o teste de Mann-Whitney. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. As diferenças encontradas entre os grupos DENV-3 foram expressas com o uso do símbolo ampersand “&”. Os valores de p foram especificados na figura.

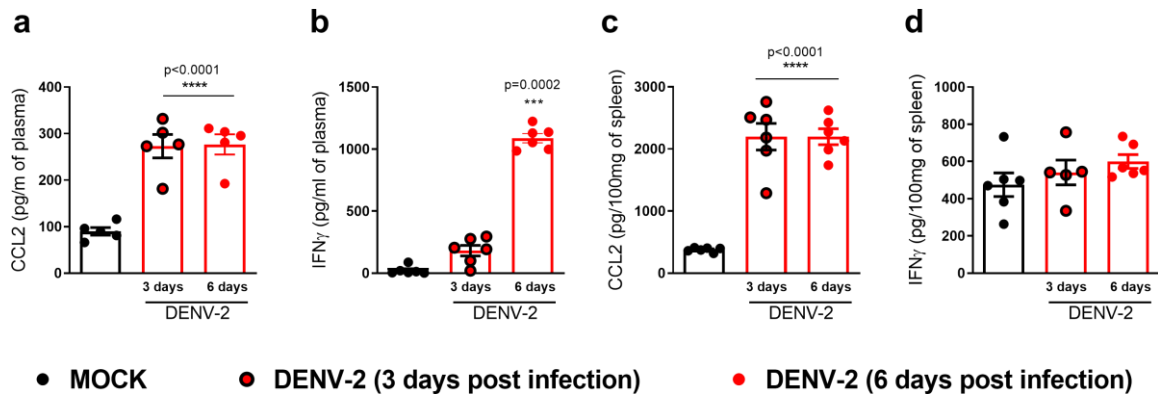


Figura 4- A infecção pelo DENV induziu o aumento de citocinas/quimiocinas no plasma e baço. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^3 PFU do DENV-3, e eutanasiados ao 3º e 6º dia após a infecção para análise de carga viral e alterações imunoinflamatórias (n=6 para Mock; n=6 para os demais grupos). **(a -b)** Dosagem das citocinas CCL2 e IFN- γ no plasma expressas em pg/ml. **(c-d)** Dosagem das citocinas CCL2 e IFN- γ no baço expressas em pg/100mg de tecido. Ambos os resultados foram expressos por média + erro padrão da média. Em **b** foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Em **a, c e d** foi aplicado o teste One-way ANOVA. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. Os valores de p foram especificados na figura.

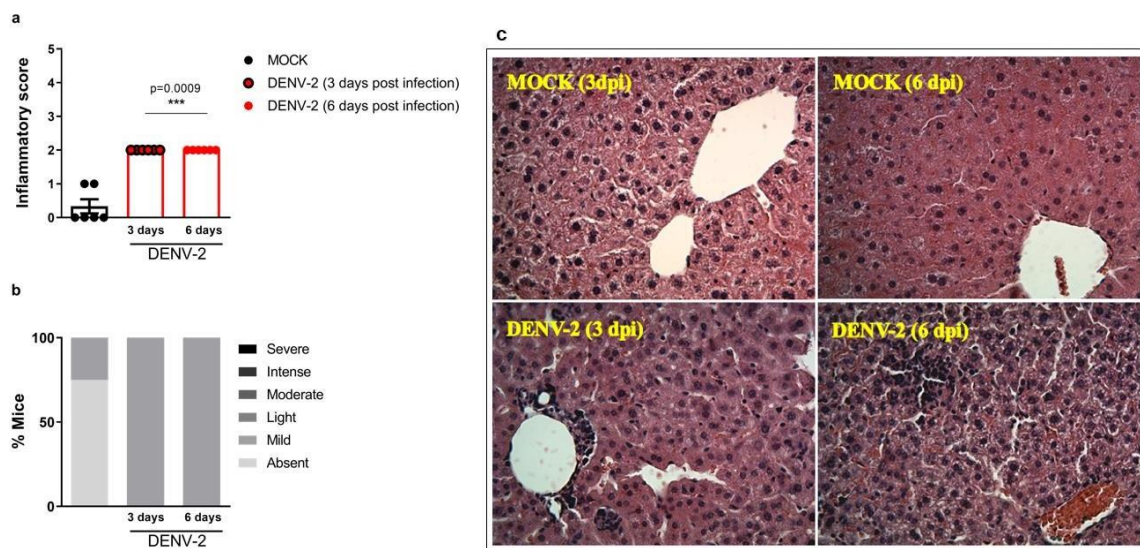


Figura 5- Animais infectados pelo DENV apresentaram infiltrado celular no tecido hepático. Camundongos A129 foram infectados com 2×10^2 PFU do DENV-2, e eutanasiados ao 3º e 6º dia após a infecção para análise de carga viral e alterações imunoinflamatórias (n=6 para todos os grupos). **(a)** Quantificação do infiltrado inflamatório no fígado. **(b)** Percentual de camundongos de acordo com o grau de infiltrado inflamatório no fígado. **(c)** Coloração H&E representativas de **a**, mostrando o infiltrado inflamatório no 3º e 6º d.p.i. Os resultados **a e b** foram expressos por média + erro padrão da média. Em **a** foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. As diferenças encontradas em relação ao grupo Mock foram expressas com o uso do símbolo asterisco “*”. O valor de p foi especificado na figura.

ANEXO III

CEUA aprovado para realização dos testes do peptídeo AH-D em cães.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

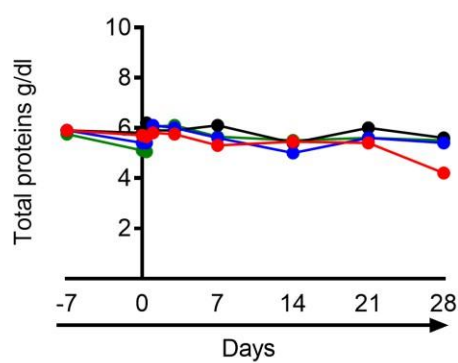
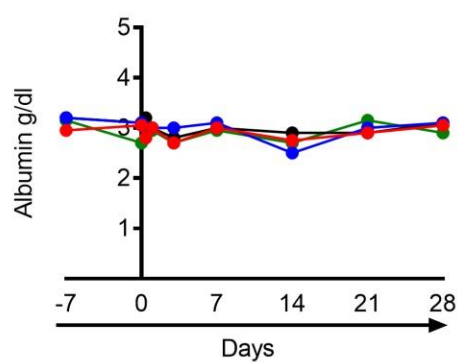
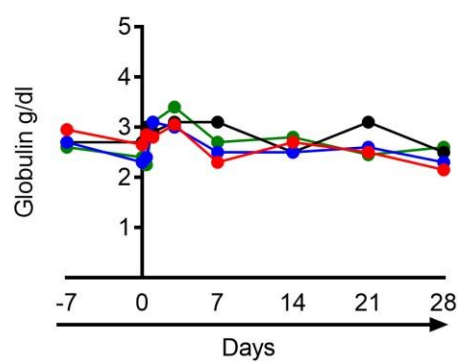
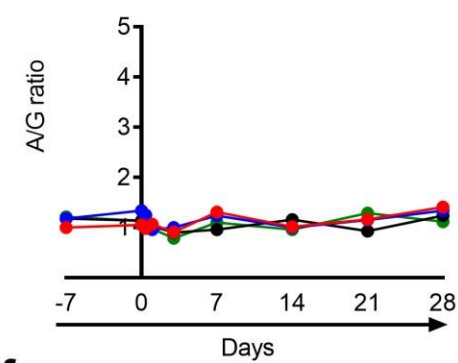
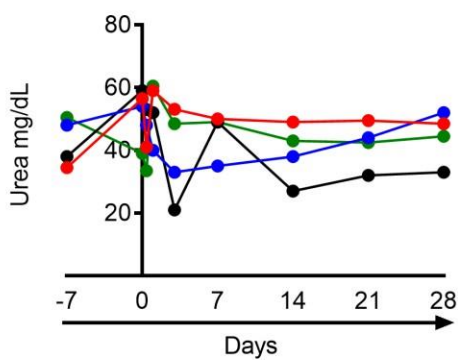
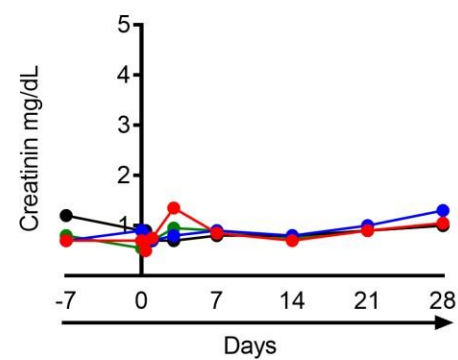
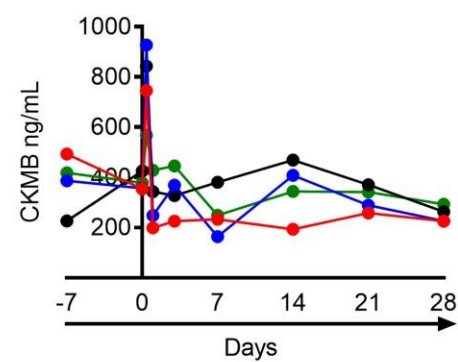
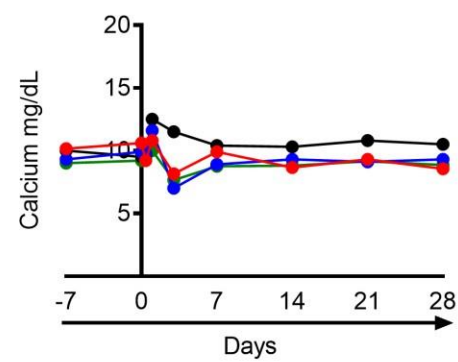
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise toxicológica do peptídeo antiviral AH-D em cães", protocolo do CEUA: 68/2020 sob a responsabilidade de Rodolfo Cordeiro Giunchetti que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 27/04/2020.

Vigência da Autorização	27/04/2020 a 26/04/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Cão / Beagles
Nº de animais	7
Peso/Idade	10kg / 6(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Canil do ICB
*Espécie/linhagem	Cão / Beagles
Nº de animais	7
Peso/Idade	10kg / 6(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Canil do ICB
*Espécie/linhagem	Cão / Beagles
Nº de animais	7
Peso/Idade	10kg / 6(meses)
Sexo	indiferente
Origem	Canil do ICB

ANEXO IV

a**b****c****d****e****f****g****h**

Vehicle
 50mg/kg
 15mg/kg
 5mg/kg

Figura 1- Perfil bioquímico de cães submetidos ao tratamento como peptídeo AH-D. Cães da raça Beagle tiveram amostras de sangue e urina coletadas para análise 7 dias antes do tratamento com o peptídeo AH-D por via intravenosa. Após a administração foram realizadas coletas com 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a administração. **(a)** Dosagem de proteínas totais expressa em g/dL. **(b)** Dosagem de albumina expressa em g/dL. **(c)** Dosagem de globulina expressa em g/dL. **(d)** Razão Albumina/Globulina **(e)** Dosagem de ureia expressa em mg/dL. **(f)** Dosagem de creatinina expressa em mg/dL. **(g)** Dosagem de CKMB expressa em mg/dL. **(h)** Dosagem de cálcio expressa em mg/dL.

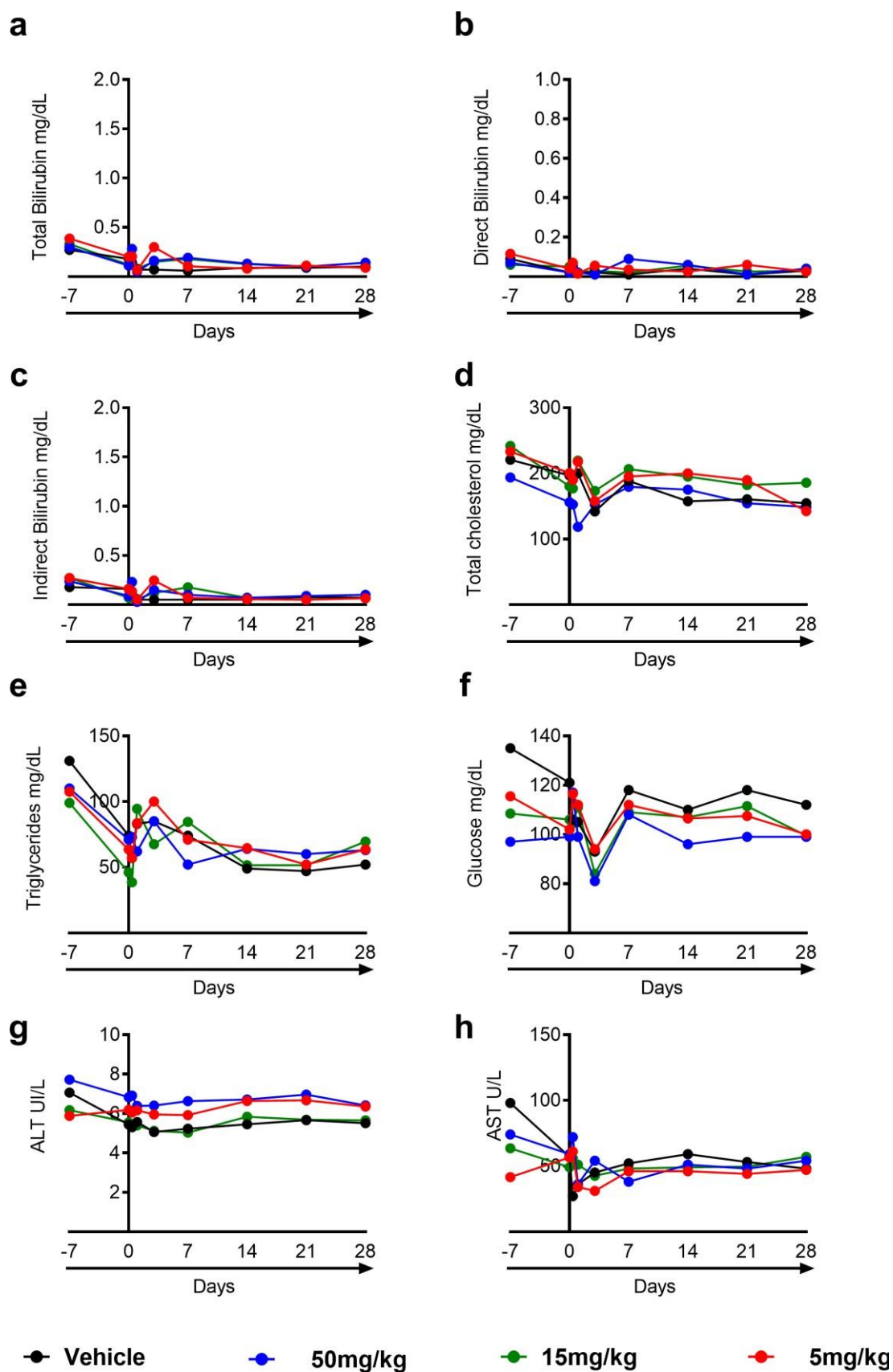


Figura 2- Perfil bioquímico de cães submetidos ao tratamento como peptídeo AH-D. Cães da raça Beagle tiveram amostras de sangue e urina coletadas para análise 7 dias antes do tratamento com o

peptídeo AH-D por via intravenosa. Após a administração foram realizadas coletas com 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a administração. **(a)** Dosagem de bilirrubina total expressa em mg/dL. **(b)** Dosagem de bilirrubina direta expressa em mg/dL. **(c)** Dosagem de bilirrubina indireta expressa em mg/dL. **(d)** Dosagem de colesterol total expressa em mg/dL. **(e)** Dosagem de triglicerídeos expressa em mg/dL. **(f)** Dosagem de glicose expressa em mg/dL. **(g)** Dosagem de ALT expressa em U/L. **(h)** Dosagem de AST expressa em U/L.

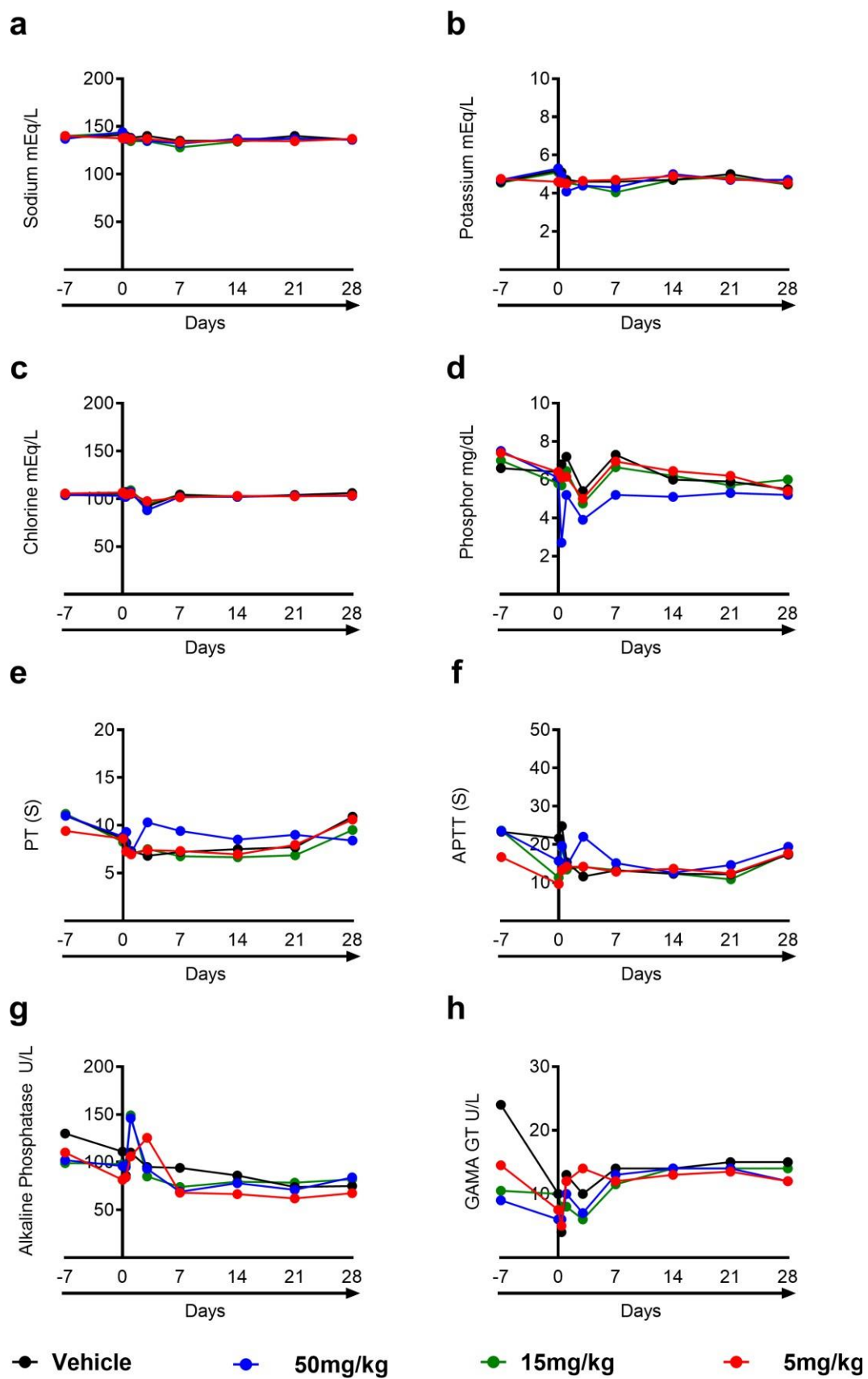


Figura 3- Perfil bioquímico e coagulatório de cães submetidos ao tratamento como peptídeo AH-D. Cães da raça Beagle tiveram amostras de sangue e urina coletadas para análise 7 dias antes do tratamento com o peptídeo AH-D por via intravenosa. Após a administração foram realizadas coletas com 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a administração. **(a)** Dosagem de sódio expressa em mEq/L. **(b)** Dosagem de potássio expressa em mEq/L. **(c)** Dosagem de cloro expressa em mEq/L. **(d)** Dosagem de fósforo expressa em mg/dL. **(e)** Tempo de pró-trombina (TP) expresso em S. **(f)** Tempo de trombina parcial ativada (TTPA) expresso em S. **(g)** Dosagem de fosfatase alcalina expressa em U/L. **(h)** Dosagem de GAMA GT expressa em U/L.

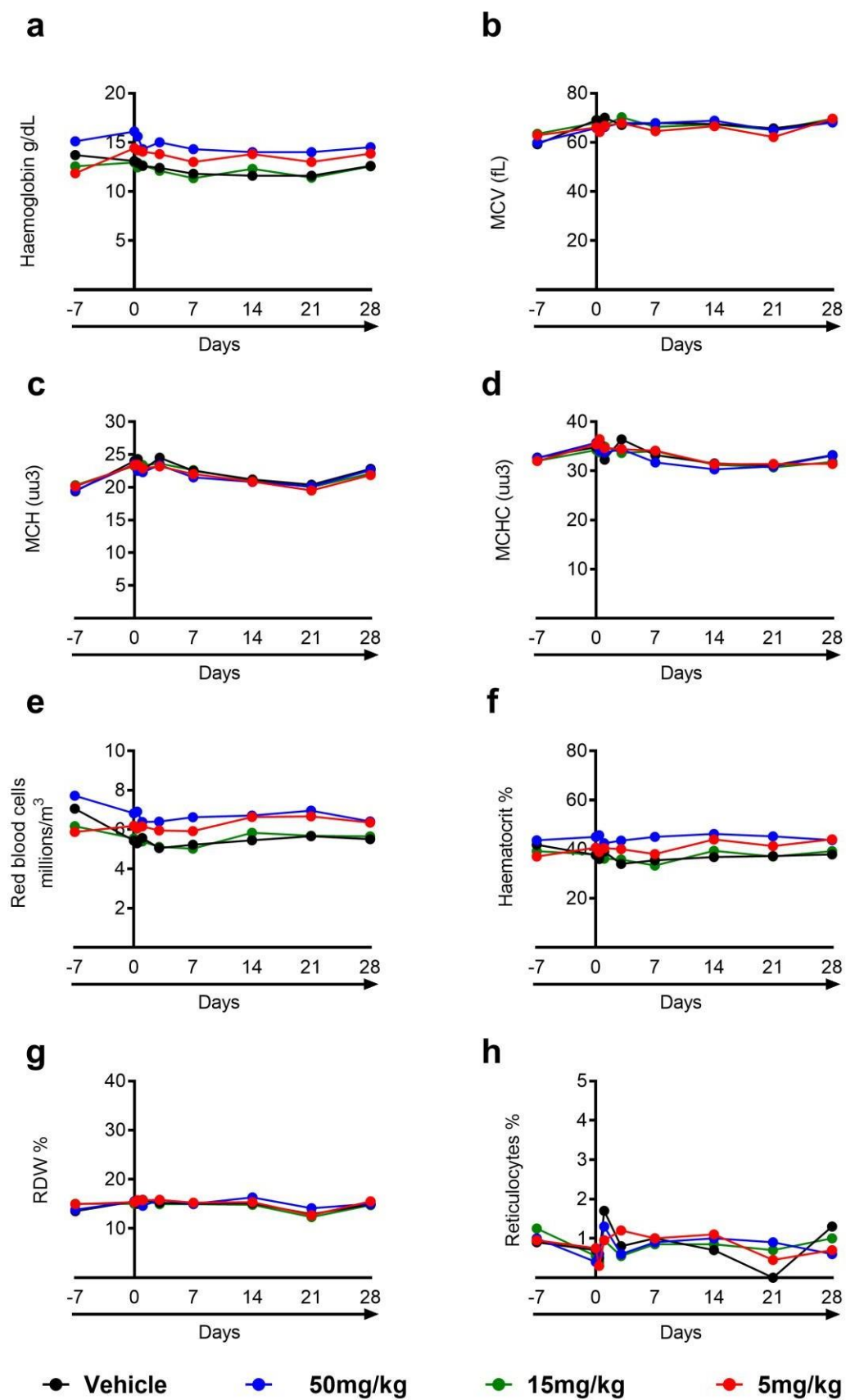


Figura 4- Perfil hematológico de cães submetidos ao tratamento como peptídeo AH-D. Cães da raça Beagle tiveram amostras de sangue e urina coletadas para análise 7 dias antes do tratamento com o peptídeo AH-D por via intravenosa. Após a administração foram realizadas coletas com 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a administração. **(a)** Dosagem de hemoglobina expressa em q/dL. **(b)** VCM expresso em fL. **(c)** HCM expressa em uu3. **(d)** CHCM expressa em uu3. **(e)** Quantidade de hemácias expressa em milhões/ m^3 . **(f)** Hematócrito expresso em %. **(g)** RDW expresso em %. **(h)** Quantidade de reticulócitos expressa em %.

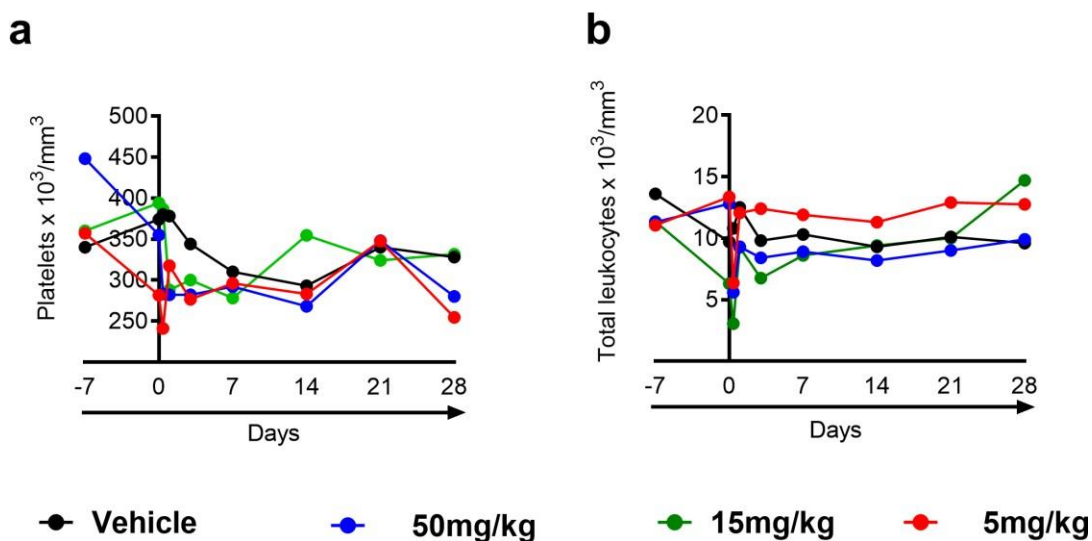





Figura 5- Perfil de plaquetas e leucócitos totais de cães submetidos ao tratamento com o peptídeo AH-D. Cães da raça Beagle tiveram amostras de sangue e urina coletadas para análise 7 dias antes do tratamento com o peptídeo AH-D por via intravenosa. Após a administração foram realizadas coletas com 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a administração. **(a)** Contagem de plaquetas x $10^3/mm^3$ de sangue. **(b)** Contagem de leucócitos totais x $10^3/mm^3$ de sangue.

ANEXO V

Trabalhos publicados em colaboração ao longo do curso.

A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations

Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade^a, Gabriel Henrique Campolina-Silva^b, Celso Martins Queiroz-Junior^a, Leonardo Camilo de Oliveira^a, Larisse de Souza Barbosa Lacerda^a, Jordane Clarisse Pimenta Gaggino^a, Filipe Resende Oliveira de Souza^a, Ian de Meira Chaves^a, Ingredy Beatriz Passos^c, Danielle Cunha Teixeira^a, Paloma Grazielle Bittencourt-Silva^d, Priscila Aparecida Costa Valadão^a, Leonardo Rossi-Oliveira^a, Maisa Mota Antunes^a, André Felipe Almeida Figueiredo^a, Natália Teixeira Wnuk^a, Jairo R. Temerozo ^{e,f}, André Costa Ferreira^{g,h,i}, Allysson Cramer^b, Cleida Aparecida Oliveira^a, Ricardo Durães-Carvalho ^j, Clarice Weis Arns^j, Pedro Pires Goulart Guimarães^d, Guilherme Mattos Jardim Costa^a, Gustavo Batista de Menezes^a, Cristina Guatimosim^a, Glauber Santos Ferreira da Silva^d, Thiago Moreno L. Souza^{g,h}, Breno Rocha Barrioni^k, Marivalda de Magalhães Pereira^k, Lirlândia Pires de Sousa^l, Mauro Martins Teixeira^b, and Vivian Vasconcelos Costa ^{a,b}




^aDepartment of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, 8430.f, Belo Horizonte, MG, Brazil

^bDepartment of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, 8430.f, Belo Horizonte, MG, Brazil



^cDepartment of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, 8430.f, Belo Horizonte, MG, Brazil

HEPATOLOGY COMMUNICATIONS

Open Access

Original Article |  Open Access |    

Molecular Mechanism for Protection Against Liver Failure in Human Yellow Fever Infection

Fernanda de Oliveira Lemos, Andressa França, Antônio Carlos Melo Lima Filho, Rodrigo M. Florentino, Marcione Loiola Santos, Dabny G. Missiaggia, Gisele Olinto Libanio Rodrigues, Felipe Ferraz Dias, Ingredy Beatriz Souza Passos, Mauro M. Teixeira, Antônio Márcio de Faria Andrade, Cristiano Xavier Lima, Paula Vieira Teixeira Vidigal, Vivian Vasconcelos Costa, Matheus Castro Fonseca, Michael H. Nathanson  M. Fatima Leite ... See fewer authors 

First published: 16 March 2020 | <https://doi.org/10.1002/hep4.1504> | Citations: 3

OPEN

In-depth characterization of a novel live-attenuated Mayaro virus vaccine candidate using an immunocompetent mouse model of Mayaro disease

Mânlio Tasso de Oliveira Mota^{1,4}, Vivian Vasconcelos Costa^{2,4*}, Michelle Amantéa Sugimoto², Georgia de Freitas Guimarães³, Celso Martins Queiroz-Junior², Thaiané Pinto Moreira², Carla Daiane de Sousa², Franciele Martins Santos², Victoria Fulgêncio Queiroz², Ingedy Passos², Josy Hubner², Danielle Gloria Souza², Scott C. Weaver³, Mauro Martins Teixeira² & Maurício Lacerda Nogueira^{1*}

