

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**IMUNOPATOLOGIA DA DENGUE:  
RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CC E  
CÉLULAS iNKT**

Rodrigo Guabiraba Brito

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

# IMUNOPATOLOGIA DA DENGUE: RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CC E CÉLULAS iNKT

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas: Farmacologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira  
(Depto. de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG)

**Co-Orientador:** Profa. Dra. Danielle G. Souza  
(Depto. de Microbiologia, ICB/UFMG)

**Aluno:** Rodrigo Guabiraba Brito

Belo Horizonte

2010

*Aos sempre magníficos condutores do  
livre pensamento e do conhecimento  
científico e social, Frank Zappa, Jack  
Kerouac e Manoel de Barros.*

"The only people for me are the mad ones,  
the ones who are mad to live, mad to talk,  
mad to be saved, desirous of everything at the same time,  
the ones who never yawn or say a commonplace thing,  
but burn, burn, burn,  
like fabulous yellow roman candles  
exploding like spiders across the stars  
and in the middle you see the blue centerlight pop  
and everybody goes "Awww!"

*Jack Kerouac*

"...que a importância de uma  
coisa não se mede com fita  
métrica nem com balanças nem  
barômetros etc. Que a  
importância de uma coisa há  
que ser medida pelo  
encantamento que a coisa  
produza em nós."

*Manoel de Barros*

"...The pojava people are boring me  
to pieces; They make me feel like I am  
wasting my time..."

*Frank Zappa, Po-Java People, 1975*

**Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do CNPq (CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO).**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Mauro Teixeira, pelos já 10 anos de ensinamentos e apoio. Sou-lhe eternamente grato pela base científica e pela forma prática de encarar algumas das dificuldades inerentes a vida acadêmica, as quais ele lida com habilidade invejável. Este trabalho é mais um reflexo de sua orientação aberta, mas criteriosa, e tantos outros ainda virão...

Ao Dr. Bernhard Ryffel e a Dra. Valérie Quesniaux (IEM/CNRS, Orléans, França), por me acolherem em seu laboratório, me integrarem sem restrições as suas respectivas equipes e me darem a liberdade de conduzir os experimentos que compõem esta tese de doutorado.

Ao Dr. François Trottein e Dra. Joelle Renneson (*Institute Pasteur Lille*, França), pela colaboração aberta e frutífera que geraram resultados que também compõem a presente tese.

A Dra. Danielle G. Souza, a Dani, pela desenvoltura científica, pelo apoio, amizade e sinceridade. Você me apresentou a Imunofarmacologia. Serei sempre grato.

A coordenação e membros da Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, pelo incentivo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante todo o doutorado, além do período de doutorado sanduíche no exterior.

Aos membros da banca pelo interesse e disponibilidade.

A minha mãe, um exemplo de coragem e superação, pelo apoio incondicional desde sempre. Estarei ao seu lado, buscando com carinho e entendimento o melhor a se viver neste caminho.

Ao amigo Rafael Elias, companheiro de trabalho e amizade garantida para qualquer momento. Devo parte deste trabalho ao seu apoio técnico e intelectual, sem contar o constante encorajamento em face das atribuições inexoráveis desta vida científica.

Aos colegas de hoje e de sempre do *Laboratório de Imunofarmacologia e anexos*, pela diversão e ciência em uma escala difícil de quantificar. Em especial ao amigo Remo, pelas várias discussões recheadas de novidades, questionamentos e idéias, a Cris, pela amizade e paciência valiosas, a Ester, Adriano, Talvani e Lucíola pelo companheirismo desde muito cedo, ao Prof. Antônio Lucio, pela amizade e bom senso e também aos essenciais: Angélica, Flávio, Flavio Lopes, Caio, Daniel Cisalpino, Gustavo, Fred, Dani Sachs, Vanessa, Kátia, Michele (*in memoriam*), Rafael Souza, Pedro Elias, Bráulio, Vivian, Mila, Fernando Lopes, Letícia, Márcia, David, Norinne, Barbara, Ciça, Roberta, Landa, Valdinéria, Ilma, Gil e tantos outros bons amigos sem os quais a convivência diária nestes últimos 10 anos seria muito menos interessante.

Aos queridos amigos franceses do *Laboratoire d'Immunologie et d'Embryologie Moléculaires*, em Orléans, França onde passei o melhor ano de minha vida científica e pessoal. Em especial a Anne-Gaëlle, por me mostrar a verdadeira França e suas raízes: ainda maior e mais viva do que eu imaginava. E aos amigos para sempre: Thomas Secher, Virginie Vasseur, Paméla Gasse, Nicolas Riteau, Louis Fauconnier, Mathilde Fauconnier, Johan Leyritz, Isabelle Maillet e Rachel Vacher. *Vous me manquez tous !*

Aos grandes amigos desta vida, Daniel Camargos, Vinicius Fonseca e Mateus Guerra, companheiros inconstantes e ainda assim tão responsáveis por toda esta forma nada convencional de “estudar” as coisas da natureza humana.

Aos amigos inclassificáveis, caríssimos Daniel Mansur, Chico Lobo, Bruno Eduardo, Diogo Magnani e Gabriel Magno. Porque o mundo será como realmente deve ser, mesmo que ainda demore: infinito. Estamos esperando.

Aos amigos da Biologia e do DA Biologia pelo apoio, companheirismo, diversão e excentricidade, dentro e fora deste Instituto de Ciências Biológicas.

A querida professora Salete, pela forma apaixonante de traduzir ciência e vida em momentos mais do que agradáveis. Este aprendizado é para a vida toda.



**LISTA DE ABREVIATURAS,  
SIGLAS E SÍMBOLOS**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- **aa** - aminoácidos
- **APC** - *Antigen-presenting cell* - Célula apresentadora de antígenos
- **ADE** - *Antibody-dependent enhancement* - Intensificação dependente de anticorpos
- **ALT** - alanina aminotransferase
- **AST** - aspartato aminotransferase
- **BSA** - *Bovine serum albumin* - Albumina de soro bovino
- **C** - *core protein* - proteína do capsídeo
- **CCL2 (MCP-1)** - *Monocyte chemoattractant protein-1*
- **CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )** - *Macrophage inflammatory protein-1 alpha*
- **CCL5 (RANTES)** - *Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*
- **CCL17 (TARC)** - *TGF-beta1-mediated regulation of thymus and activation-regulated chemokine*
- **CD ()** - *cluster of differentiation ()*
- **cm** - centímetro - unidade de comprimento
- **CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono
- **CTLs** - Linfócito T citolítico ou citotóxico
- **CXCL1 (KC)** - *keratinocyte derived chemokine*
- **DCs** - *Dendritic cells* - células dendríticas
- **DC-SIGN** - *Dendritic cell - specific intracellular adhesion molecule 3(ICAM-3)-grabbing nonintegrin*
- **DENV-2** - vírus da dengue sorotipo 2
- **DL<sub>50</sub>** - *dose necessária para matar 50% de animais* (Dose letal 50)
- **DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- **DNA** - ácido desoxirribonucléico
- **E** - *proteína E* do envelope
- **E-NS1** - proteína do envelope - proteína não-estrutural 1
- **EDTA** - *EthyleneDiamineTetracetic acid* - Ácido etilenodiamino tetraacético
- **ELISA** - *Enzyme linked immunosorbent assay*
- **EPM** - Erro padrão da média

- **FcγR** - *Fc gamma receptor. Receptor Fc γ*
- **FD** - Febre do dengue
- **FHD** - Febre hemorrágica do dengue
- **g** - grama - unidade de massa
- **GRP78/BiP** - *78-kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin binding protein*
- **h** - hora - unidade de tempo
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio
- **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** - Ácido sulfúrico
- **HCV** - *Hepatitis C virus* - Vírus da Hepatite C
- **HLA** - *Human leukocyte antigen*
- **Hsp ()** - *heat shock protein()*
- **HTAB** - *hexadecyltrimethylammonium*
- **i.c.** - intracerebral
- **i.p.** - intraperitoneal
- **i.v.** - intravenoso
- **IFN-αβ** - Interferon alfa-beta
- **IFN-γ** - *Interferon gamma*
- **IL- ()** - *interleucin - ()*
- **iNOS** - *Inducible Nitric Oxide Synthase*
- **JNK** - *Janus kinase*
- **KO** - *Knock-out* - geneticamente deficiente para determinado gene ou função
- **L-SIGN** - *liver/lymph node- specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*
- **M** - molar - unidade de medida de concentração
- **MEM** - *Modified Eagle's Medium*
- **MHC ()** - complexo principal de histocompatibilidade ()
- **mRNA** - RNA mensageiro
- **min** - minutos – unidade de tempo
- **ml** - mililitro – unidade de volume
- **mm<sup>2</sup>** - milímetro quadrado – unidade de área
- **MPO** – *Myeloperoxidase/Mieloperoxidase*
- **N ou n** - número de repetições ou animais

- **NaCl** - Cloreto de sódio
- **NADPH** - Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
- **NaPO<sub>4</sub>** - Fosfato de sódio
- **ND** - não detectável
- **NK** - *Natural Killer*
- **NKT** - *Natural killer T cells*
- **NS1** - Proteína não-estrutural 1
- **NS2a** - Proteína não-estrutural 2a
- **NS2b** - Proteína não-estrutural 2b
- **NS3** - Proteína não-estrutural 3
- **NS4a** - Proteína não-estrutural 4a
- **NS4b** - Proteína não-estrutural 4b
- **NS5** - Proteína não-estrutural 5
- **nm** - nanômetro - unidade de comprimento
- **NO** - *Nitric oxide* - Óxido nítrico
- **NOS** - *Nitric Oxide Synthase* - Óxido nítrico sintase
- **°C** - grau Celsius, escala de medida de temperatura
- **OD** - optical density
- **OPD** - *o-phenylenediamine dihydrochloride*
- **OMS** - Organização Mundial de Saúde
- **p/v** - peso por volume - unidade de medida de concentração
- **PBMCs** - (células mononucleares do sangue periférico)
- **PBS** - *phosphate-buffered saline*
- **UFP** - unidade formadora de placas
- **pg** - picograma - unidade de massa
- **PKR** - *protein kinase regulated by double-stranded RNA*
- **RE** – Retículo endoplasmático
- **RNA** - *ribonucleic acid* - ácido ribonucleico
- **SCD** - Síndrome de Choque do Dengue
- **SDS** - *Sodium dodecyl sulfate*
- **SFB** - soro fetal bovino
- **STAT** - *Signal Transducers and Activators of Transcription protein*

- **Th()** - linfócitos T auxiliares do tipo ()
- **TNF- $\alpha$**  - *Tumor necrosis factor-alpha/Fator de necrose tumoral-alfa*
- **U/mL** - unidade por mililitro, unidade de medida de concentração
- **WT** - *Wild type*
- **WHO** - *World Health organization*
- **WNV** – *West Nile virus* – Vírus da febre do oeste do nilo
- **$\mu\text{g/ml}$**  - micrograma por mililitro, unidade de medida de concentração
- **$\mu\text{l}$**  - microlitro - unidade de volume

**RESUMO**

O *Dengue virus* (DENV), um flavivirus transmitido por mosquitos, é um sério problema de saúde pública em países tropicais. Mecanismos da resposta imune na infecção ainda não estão bem elucidados. Dados clínicos têm mostrado uma associação entre níveis de quimiocinas CC no plasma e a severidade da doença. Neste contexto, avaliamos o papel de receptores de quimiocinas CC, CCR1, CCR2 e CCR4, na infecção pelo dengue utilizando animais KO para estes receptores. Além disso, avaliamos *in vivo* a contribuição de células NKT invariáveis (iNKT), linfócitos T  $\alpha\beta$  não convencionais, na resposta do hospedeiro utilizando uma amostra de DENV-2 adaptada em camundongos que leva a uma infecção que se assemelha ao quadro de FHD/SCD. Camundongos C57/Bl6 (WT) apresentam sinais clínicos e dano tecidual, incluindo trombocitopenia, hemoconcentração, níveis elevados de transaminases e citocinas pró-inflamatórias, além de mortalidade. Quimiocinas CC, como CCL2, CCL3 e CCL5, são produzidas no baço e fígado de animais WT. Animais CCR1<sup>-/-</sup> possuem fenótipo moderado, com doença e mortalidade similares a animais WT. Em animais CCR2<sup>-/-</sup> a mortalidade, dano hepático, níveis de IL-6 e IFN- $\gamma$ , e ativação de leucócitos foram atenuadas. Entretanto, trombocitopenia, hemoconcentração e níveis sistêmicos de TNF- $\alpha$  foram similares aos de animais WT. CCL17, um ligante de CCR4, é produzido durante a infecção. Em animais CCR4<sup>-/-</sup> a mortalidade, lesão tecidual e inflamação sistêmica estão fortemente reduzidas. Mesmo com diferenças no perfil de doença em animais KO, não houve alterações na carga viral. Células iNKT esplênicas e hepáticas são ativadas e produzem IFN- $\gamma$  na infecção. Animais deficientes em iNKT (J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>) são bastante resistentes a infecção, comparados a animais WT. Este fenótipo é parcialmente revertido pela transferência de células iNKT purificadas para animais J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>. Estes animais apresentam resposta inflamatória reduzida, com baixos níveis de IL-6, IFN- $\gamma$  e CXCL1, reduzida lesão hepática e menor ativação de células NK e neutrófilos. A carga viral no baço e fígado também foi reduzida. Tratamento com  $\alpha$ GalCer e a deleção de CD1d não alteram o fenótipo observado em animais WT. Em resumo, receptores de quimiocinas CC têm papéis diferentes na infecção pelo DENV-2 e a ativação endógena de células iNKT durante a infecção contribui de forma importante para a resposta sistêmica e local associada a síndrome do choque pelo dengue em camundongos.

**ABSTRACT**

*Dengue virus* (DENV), a mosquito-borne flavivirus, is a serious public health problem in many tropical countries. Immune mechanisms involved in the pathogenesis of DENV infection are not fully elucidated. Recent clinical data showed an association between levels of different CC chemokines in plasma and severity of dengue. In this regard, we evaluated the role of CC chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in dengue infection using KO mice for these receptors. Furthermore, we assessed the *in vivo* contribution of invariant Natural Killer T (iNKT) cells, non-conventional  $\alpha\beta$  T lymphocytes, to the host response using a mouse-adapted DENV-2 strain that causes a disease resembling severe dengue infection. Infected C57/Bl6 mice (WT) presented clinical disease and tissue damage, including thrombocytopenia, hemoconcentration, increased levels of transaminases and pro-inflammatory cytokines, and lethality. CC chemokines, such as CCL2, CCL3 and CCL5, are strongly produced in spleen and liver of WT mice. CCR1<sup>-/-</sup> mice had a mild phenotype with disease presentation and lethality similar to those of WT mice. In CCR2<sup>-/-</sup> mice, lethality, liver damage, levels of IL-6 and IFN- $\gamma$ , and leukocyte activation were attenuated. However, thrombocytopenia, hemoconcentration and systemic TNF- $\alpha$  levels were similar to infected WT mice. CCL17, a CCR4 ligand, is produced upon infection. In CCR4<sup>-/-</sup> mice, lethality, tissue injury and systemic inflammation were markedly decreased. Despite differences in disease presentation in CCR-deficient mice, there were no significant differences in viral load. Splenic and hepatic iNKT cells became activated and produce IFN- $\gamma$  upon infection. Mice deficient in iNKT cells (J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>) are highly resistant to the infection when compared to WT animals. The phenotype was partially recovered by adoptive transfer of iNKT cells to J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> animals. J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice presented decreased systemic and local inflammatory responses, with lower levels of IL-6, IFN- $\gamma$  and CXCL1, reduced liver injury and diminished activation of NK cells and neutrophils. Viral load in spleen and liver was also lower in J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice relative to WT mice.  $\alpha$ GalCer treatment and CD1d ablation had no effects in disease progression. In conclusion, CC chemokine receptors have discrete roles in DENV-2 and endogenous iNKT cell activation during DV infection contributes to the systemic and local inflammatory responses that lead to shock and death, suggesting that CC chemokine receptors and iNKT cells may be associated to the inflammatory response involved in dengue shock syndrome in mice.

---

## SUMARIO

<b>I. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
<b>1. IMUNIDADE, OS VÍRUS E A DENGUE.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2. A FAMÍLIA <i>FLAVIVIRIDAE</i> E A BIOLOGIA DO DENGUE VÍRUS.....</b>	<b>25</b>
1.2.1. INTERAÇÕES COM O HOSPEDEIRO .....	28
1.2.2. MANIFESTAÇÕES DA DOENÇA E MODELOS EXPERIMENTAIS .....	30
1.2.3. AS CONTROVÉRSIAS E A INFECÇÃO SECUNDÁRIA PELO DENGUE .....	31
<b>1.3. A RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA INFECÇÃO PELO DENGUE.....</b>	<b>33</b>
1.3.1. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS: CITOCINAS E QUIMIOCIAS .....	34
1.3.1.1. CITOCINAS E A INFECÇÃO PELO DENGUE .....	35
1.3.1.2. QUIMIOCIAS: FUNÇÃO E ESTRUTURA .....	36
1.3.1.3. QUIMIOCIAS DA FAMÍLIA CC E INFECÇÕES VIRAIS.....	41
1.3.1.4. QUIMIOCIAS NA RESPOSTA A INFECÇÃO PELO DENGUE.....	42
<b>1.4. CÉLULAS NKT INVARIANTES (iNKT) .....</b>	<b>46</b>
1.4.1. DEFINIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO.....	46
1.4.2. A MOLÉCULA CD1D.....	47
1.4.3. RECONHECIMENTO DE ANTÍGENOS GLICOLÍDICOS POR CÉLULAS iNKT .....	48
1.4.4. VIAS DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS iNKT .....	49
1.4.5. PAPEL DE CÉLULAS iNKT EM INFECÇÕES MICROBIANAS .....	50
1.4.6. CÉLULAS iNKT, TLRs E EVASÃO.....	53
1.4.7. O PAPEL DE CÉLULAS iNKT NA RESPOSTA IMUNE EM INFECÇÕES VIRAIS .....	54
1.4.8. QUIMIOCIAS E O TRAFEGO DE CÉLULAS iNKT .....	58
<b>II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
<b>2.1. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>62</b>
<b>2. 2. OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
2.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 1 .....	63
2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 2 .....	64
<b>III. MATERIAL E METODOS .....</b>	<b>66</b>
<b>3.1. ANIMAIS.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2. VÍRUS.....</b>	<b>67</b>



<b>3.3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>68</b>
<b>3.4. COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>72</b>
<b>3.5. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....</b>	<b>72</b>
<b>3.6. TITULAÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE.....</b>	<b>72</b>
<b>3.7. DOSAGEM DE TRANSAMINASES HEPÁTICAS TGO E TGP .....</b>	<b>73</b>
<b>3.8. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS .....</b>	<b>73</b>
<b>3.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO) TECIDUAL.....</b>	<b>74</b>
<b>3.10. PREPARAÇÃO DOS CORTES PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA .....</b>	<b>74</b>
<b>3.11. PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS INKT E TRANSFERÊNCIA ADOTIVA.....</b>	<b>75</b>
<b>3.12. TRATAMENTO COM O ATIVADOR DE CÉLULAS NKT AGALCER .....</b>	<b>75</b>
<b>3.13. ANÁLISE DE POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)</b> <b>.....</b>	<b>75</b>
3.13.1. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS DO BAÇO E FÍGADO .....	75
3.13.2. MARCAÇÃO COM ANTICORPOS ESPECÍFICOS .....	76
<b>3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>78</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
<b>4.1. MORTALIDADE E PERDA DE PESO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO</b> <b>DENV-2 .....</b>	<b>81</b>
<b>4.2. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E CARGA VIRAL .....</b>	<b>83</b>
<b>4.3. INFLAMAÇÃO E LESÃO HEPÁTICA .....</b>	<b>86</b>
<b>4.4. CITOCINAS E QUIMIOCINAS NA RESPOSTA SISTÊMICA .....</b>	<b>90</b>
<b>4.5. NÚMERO E ATIVAÇÃO DE LEUCÓCITOS NO BAÇO APÓS INFECÇÃO PELO</b> <b>DENV-2 .....</b>	<b>94</b>
<b>4.6. ATIVAÇÃO DE CÉLULAS INKT DURANTE A INFECÇÃO PELO DENV-2.....</b>	<b>98</b>
<b>4.7. MORTALIDADE E PERDA DE PESO EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA</b> <b>CÉLULAS INKT (JA18<sup>-/-</sup>) OU PARA CD1D.....</b>	<b>102</b>
<b>4.8. CAMUNDONGOS JA18<sup>-/-</sup> DESENVOLVEM DOENÇA MENOS GRAVE APÓS A</b> <b>INFECÇÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>4.9. CAMUNDONGOS JA18<sup>-/-</sup> APRESENTAM MENOR PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRO-</b> <b>INFLAMATÓRIAS .....</b>	<b>107</b>

<b>4.10. REDUÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS NK E NEUTRÓFILOS DURANTE A INFECÇÃO PELO DENV-2 EM CAMUNDONGOS JA18<sup>-/-</sup> .....</b>	<b>112</b>
<b>4.11. RELAÇÃO ENTRE CÉLULAS INKT E CARGA VIRAL EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO DENV-2 .....</b>	<b>116</b>
<b>4.12. EFEITOS DO TRATAMENTO COM AGAL-CER SOBRE A MORTALIDADE E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DURANTE A INFECÇÃO COM DENV-2 .....</b>	<b>118</b>
<b>V. DISCUSSÃO .....</b>	<b>121</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>122</b>
<b>VI. CONCLUSÃO .....</b>	<b>135</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>136</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>137</b>
<b>BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>137</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>138</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>157</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>158</b>
<i>ROLE OF THE CHEMOKINE RECEPTORS CCR1, CCR2 AND CCR4 IN THE PATHOGENESIS OF EXPERIMENTAL DENGUE INFECTION IN MICE .....</i>	<i>158</i>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>159</b>
<i>A DETRIMENTAL ROLE FOR INVARIANT NATURAL KILLER T CELLS IN THE PATHOGENESIS OF DENGUE VIRUS INFECTION .....</i>	<i>159</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição dos sorotipos do Dengue vírus entre os continentes	<b>24</b>
<b>Figura 2:</b> Óbitos por febre hemorrágica do dengue no Brasil em 2009	<b>25</b>
<b>Figura 3:</b> Transmissão do vírus da Dengue	<b>25</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema simplificado para a replicação de um flavivirus na célula do hospedeiro	<b>29</b>
<b>Figura 5.</b> Quimiocinas e seus receptores	<b>37</b>
<b>Figura 6.</b> Receptores para quimiocinas CC e sua sinalização	<b>40</b>
<b>Figura 7.</b> Vias de ativação propostas para células iNKT	<b>51</b>
<b>Figura 8.</b> Alinhamento da seqüência do DENV-2 adaptado em camundongos	<b>70</b>
<b>Figura 9.</b> <i>Design</i> experimental esquemático proposto para os Objetivos 1 e 2	<b>71</b>
<b>Figura 10.</b> Determinação das regiões ( <i>gates</i> ) referentes às populações leucocitárias analisadas nos órgãos alvo	<b>80</b>
<b>Figura 11.</b> Mortalidade e perda de peso após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas	<b>82</b>
<b>Figura 12.</b> Alterações hematológicas e carga viral após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas	<b>85</b>
<b>Figura 13.</b> Níveis de transaminases e acúmulo de neutrófilos no tecido após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas	<b>87</b>
<b>Figura 14.</b> Produção de citocinas no fígado após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas	<b>88</b>
<b>Figura 15.</b> Alterações histológicas no fígado após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas	<b>89</b>
<b>Figura 16.</b> Produção de quimiocinas no fígado após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas	<b>91</b>
<b>Figura 17.</b> Produção de citocinas no soro após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas	<b>91</b>
<b>Figura 18.</b> Produção de citocinas quimiocinas no baço após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas	<b>93</b>
<b>Figura 19.</b> Leucócitos e perfil de ativação após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas	<b>95</b>
<b>Figura 20.</b> Perfil de células NK, macrófagos e neutrófilos após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas	<b>97</b>

- Figura 21.** Ativação de células iNKT durante a infecção pelo DENV-2 **100**
- Figura 22.** Produção de IFN- $\gamma$  por células iNKT e NK durante a infecção pelo DENV-2 **101**
- Figura 23.** Variação do peso corporal e mortalidade induzida pelo DENV-2 em animais WT e deficientes para iNKT ( $J\alpha 18^{-/-}$ ) **103**
- Figura 24.** Variação do peso corporal e mortalidade induzida pelo DENV-2 em animais WT e deficientes para CD1d **105**
- Figura 25.** Cinética de hemoconcentração após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  **105**
- Figura 26.** Alterações hematológicas após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  **106**
- Figura 27.** Produção de citocinas no soro após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  **108**
- Figura 28.** Alterações histológicas no fígado após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  **108**
- Figura 29.** Produção de citocinas e quimiocinas no baço após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  **109**
- Figura 30.** Produção de citocinas no baço após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  **111**
- Figura 31.** Produção de citocinas no fígado após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  **111**
- Figura 32.** Porcentagem e ativação de células NK durante a infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  **113**
- Figura 33.** Porcentagem e ativação de linfócitos T durante a infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  **115**
- Figura 34.** Carga viral no baço e fígado de camundongos WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  após infecção pelo DENV-2 **117**
- Figura 35.** Mortalidade, perda de peso e hematologia em camundongos WT tratados com  $\alpha$ Gal-Cer e infectados com DENV-2 **119**
- Figura 36.** Carga viral no baço e fígado de camundongos WT tratados com  $\alpha$ Gal-Cer e infectados com DENV-2 **120**

# **I. REVISÃO DA LITERATURA**

## 1. Resposta imune, os vírus e a dengue

Em termos históricos, imunidade se origina de “proteção” contra doenças infecciosas. Células e moléculas envolvidas na imunidade formam o sistema imunológico (ou sistema imune), componente essencial da fisiologia do organismo, e a sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas ao indivíduo é então classificada como resposta imune. O sistema imune tem como função fisiológica essencial a defesa contra substâncias estranhas, sejam elas macromoléculas, proteínas ou polissacarídeos, por exemplo, ou microrganismos infecciosos (Abbas e Lichtman, 2009). A origem do termo imunidade remete ao latim *immunitas*, o que se referia a proteção contra processos legais os quais senadores romanos possuíam durante o seu mandato (Abbas e Lichtman, 2005). Tucídides, ainda no século V a.C., foi quem utilizou o termo referindo-se a uma infecção a qual chamou vagamente de “peste”. O conceito de imunidade pode ser ainda mais remoto, como sugere o antigo costume na China de se estimular a imunidade das crianças contra a varíola através da inalação de um pó da lesão cutânea obtida da pele de pacientes se recuperando da doença (Abbas e Lichtman, 2005). Dentre a plêiade de agentes infecciosos capazes de desencadear uma resposta por parte de um hospedeiro destacamos aqui os vírus.

A descrição inicial dos vírus os classificou como “agentes filtráveis”, devido ao seu reduzido tamanho permitir a passagem através de filtros utilizados então para reter bactérias (Tortora *et al.*, 2002). Dmitri Iwanowski descreveu o fenômeno em 1892, onde buscava desvendar a etiologia da doença do mosaico do tabaco (TMD). Estes primeiros pesquisadores não podiam imaginar, naquela época, que partículas submicroscópicas poderiam ser agentes causadores de doenças. Este tipo de agente infeccioso foi então classificado como um *contagium vivum fluidum* ou “fluido contagioso”. Por volta de 1930 a utilização do termo vírus, do latim “veneno”, já era comum para descrever os chamados “agentes filtráveis”. Em 1935, Wendell Stanley isolou finalmente o vírus do mosaico do tabaco, permitindo o desenvolvimento de estudos químicos e estruturais com um vírus purificado, fato inédito até o momento. De forma também importante, a invenção do microscópio eletrônico possibilitou, pela primeira vez, a visualização de um vírus (Tortora *et al.*, 2002).

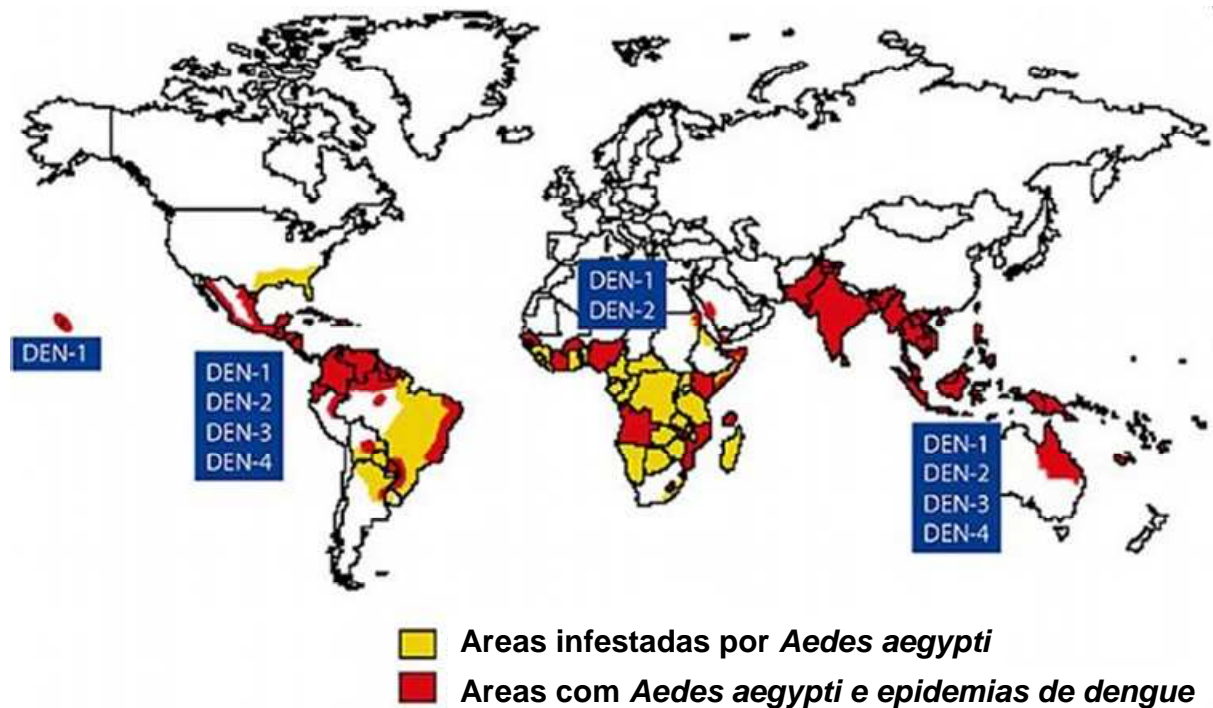
A primeira doença humana associada a um vírus foi a febre amarela (Chambers *et al.*, 1990; Tortora *et al.*, 2002). Diferentemente do observado para

outros microrganismos, os vírus são agentes infecciosos que necessitam da maquinaria bioquímica celular do hospedeiro para sua replicação, sendo, portanto, classificados como parasitas intracelulares obrigatórios. São constituídos no geral por um genoma de ácido nucléico (desoxirribonucléico) (DNA) ou ribonucléico (RNA); empacotados em uma estrutura de constituição protéica (capsídeo) podendo ainda apresentar uma membrana externa de origem protéica ou lipídica denominada envelope. O vírion ainda pode conter enzimas essenciais e/ou acessórias, além de outras proteínas (Murray *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2006). Os vírus são capazes de infectar uma grande variedade de populações celulares utilizando as moléculas fisiológicas da superfície celular, como receptores para permitir sua adsorção às células alvo. A replicação viral interfere com a síntese e função das proteínas celulares normais e leva à lesão e, por fim, à morte da célula infectada. Em infecções virais latentes pode haver prejuízo pelo estímulo da síntese de proteínas que alteram determinadas funções celulares. Os mecanismos envolvendo estas respostas são diversos e ainda não completamente descritos (Tortora *et al.*, 2002; Abbas e Lichtman, 2009)

O vírus da dengue merece atenção especial dentre os diversos vírus capazes de infectar e causar doenças na espécie humana. O relato de uma infecção semelhante à causada pelo vírus da dengue consta em uma enciclopédia de medicina chinesa datada do ano 992 d.C. (Gubler, 1998). Benjamin Rush descreveu na Filadélfia, em 1780, uma epidemia caracterizada por febre, dor de cabeça, náusea e vômitos, além de intensas dores musculares e articulares, com eventuais manifestações hemorrágicas (Rigau-Perez, 2006). Esta síndrome foi denominada “febre quebra-ossos”. Em Madrid (1801), uma síndrome similar foi nomeada “dengue”, que em espanhol significa melindre ou lamúria, e se refere ao estado bastante deteriorado dos acometidos (Rigau-Perez, 1998). Ao final do século XVIII uma doença caracterizada como dengue causou epidemias intermitentes na Ásia e nas Américas. Entre os séculos XIX e XX o vírus se disseminou por áreas tropicais e subtropicais (Hayes e Gubler, 1992; Monath, 1994).

A febre hemorrágica do dengue (FHD), a forma mais grave da doença, tem seu primeiro registro datado de 1953 em Manila, no leste asiático (Halstead, 1980). Nos últimos 60 anos, este tipo de manifestação se tornou um grave problema de saúde pública no leste asiático e na região pacífica ocidental (Holmes e Twiddy, 2003). A cada década o número de casos, de países afetados e a distribuição

geográfica da doença têm crescido rapidamente (Figura 1). Estima-se hoje que cerca de três bilhões de pessoas, distribuídas por mais de 100 países, estão sob o risco de infecção pelo vírus da Dengue (WHO). Por volta de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas a cada ano e, dentre esses casos, 250 a 500 mil pessoas desenvolvem a forma mais grave da doença (WHO).

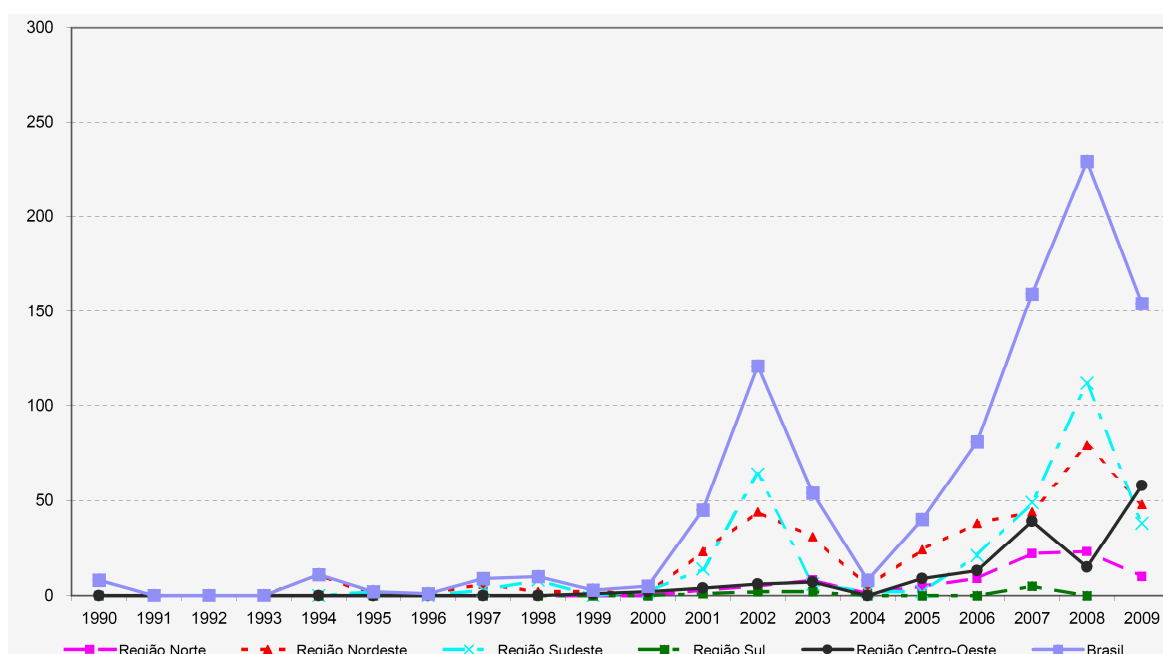


**Figura 1. Distribuição dos sorotipos do Dengue vírus entre os continentes.** A associação entre a presença de mais de um sorotipo do vírus com a presença de um mosquito vetor, no caso o *Aedes aegypti*, é considerado como fator determinante para estabelecimento da epidemia em determinado local. América latina e sudeste asiático são as áreas mais críticas. Adaptado de <http://www.chikungunya.in/what-causes-chikungunya-fever.shtml>.

No que diz respeito ao Brasil, o Ministério da Saúde brasileiro registrou em 2007, no período de janeiro a julho, 438.949 casos de dengue clássica, 926 casos de FHD e a ocorrência de 98 óbitos. Outro aspecto epidemiológico relevante em 2007 relaciona-se a concentração de casos de FHD, sendo 68% das notificações nos estados do Ceará, Rio de Janeiro, Maranhão, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Piauí. A mesma característica é observada em relação aos óbitos, concentrando-se 50% nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Pará e Piauí. A análise destes dados demonstra a expressiva ocorrência dos casos de dengue em municípios que não constituem aglomerados urbanos complexos, ou seja, aqueles



com menos de 1.000.000 de habitantes. Por outro lado demonstra também o impacto positivo das iniciativas realizadas em alguns grandes centros urbanos, a exemplo do Plano Integrado de Ações de Controle da Dengue na Região Metropolitana de Belo Horizonte, o “Pan Sem Dengue” na região metropolitana do Rio de Janeiro e o Plano de Intensificação Verão 2007 no município de São Paulo, que foram capazes de conter a explosão de casos nestes grandes aglomerados urbanos. Os números relativos à epidemia de dengue no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, têm aumentado e ainda são alarmantes na esfera da saúde pública como mostram os registros até 2009 (Figura 2).



**Figura 2: Óbitos por febre hemorrágica do dengue no Brasil em 2009.** Dados obtidos da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) e atualizados em 15/03/2009. Adaptado de [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id\\_area=1498](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id_area=1498).

## 1.2. A família *Flaviviridae* e a biologia do Dengue vírus

Os membros da família *Flaviviridae* representam um importante grupo de vírus envelopados cujo genoma é constituído por RNA de fita simples positivo. Possuem importante impacto saúde pública em função de sua ampla distribuição e de sua grande habilidade em causar significativa morbidade e mortalidade em humanos. Compreendem mais de 70 espécies já identificadas sendo que

aproximadamente metade é capaz de causar doença em humanos. A maioria dos flavivírus é transmitida aos humanos através da picada de mosquitos ou carrapatos, mesmo que ainda existam espécies sem vetor conhecido (Chambers *et al.*, 1990; Mackenzie *et al.*, 2004; Gould e Solomon, 2008; Pierson e Diamond, 2008). As infecções causadas pelos flavivírus resultam em manifestações clínicas que variam desde uma doença febril branda até as formas mais graves como a encefalite e a febre hemorrágica. Dentre os importantes representantes deste grupo podemos citar: o vírus da febre amarela, os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV 1-4), o vírus da encefalite japonesa, o vírus da encefalite do oeste do Nilo (*West Nile virus* ou *WNV*), o vírus da encefalite de Powassan e o vírus da encefalite de St. Louis, entre outros. Dentre estes, os DENV 1-4 e o WNV, são considerados emergentes ou re-emergentes, dado que nas últimas décadas a incidência de doença humana causada por estes tem aumentado em uma taxa elevada (Chambers *et al.*, 1990; Pierson e Diamond, 2008).

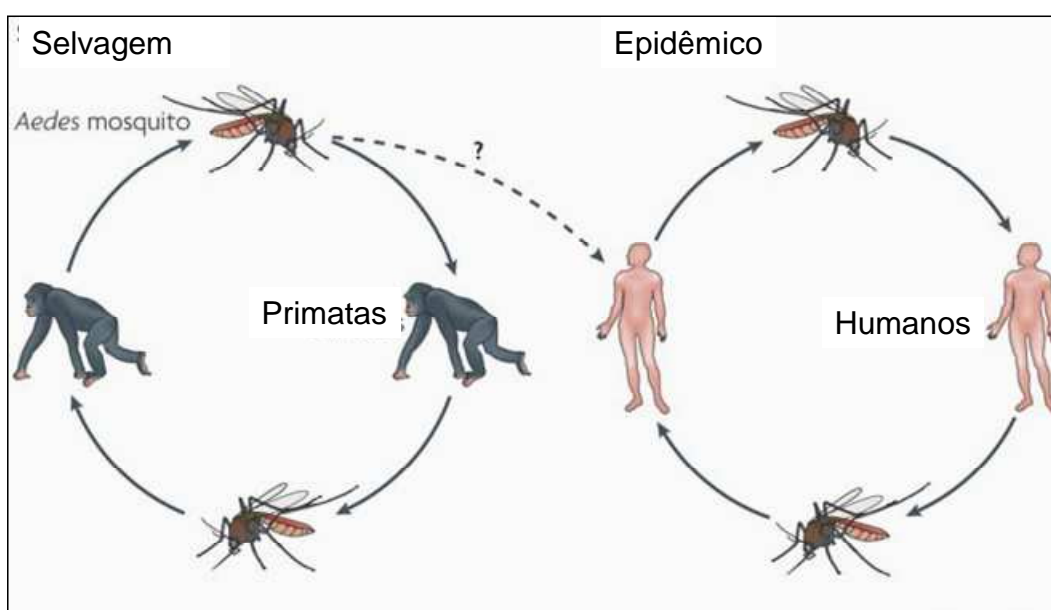
O vírus da dengue (DENV) é o agente etiológico da mais importante arbovirose da atualidade (Shrestha, Kyle, Robert Beatty, *et al.*, 2004). A dengue é associada com inúmeras epidemias urbanas e é hoje a maior ameaça de saúde pública nos países em desenvolvimento. No momento não existem tratamentos específicos ou vacina disponível para a doença (Holmes e Twiddy, 2003; Shrestha, Kyle, Robert Beatty, *et al.*, 2004; Pang *et al.*, 2007; Kyle e Harris, 2008).

O DENV possui um genoma constituído por uma fita única de RNA, de sentido positivo, como os outros flavivirus, formada por cerca de onze mil bases. Sua tradução dá origem a uma poli-proteína grande, cujo processamento co-traducional por enzimas virais e do hospedeiro origina três proteínas estruturais (proteínas C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), envolvidas na replicação viral (Chambers *et al.*, 1990). Os humanos são os principais hospedeiros do vírus da dengue sendo que a transmissão se dá pela picada de fêmeas do mosquito do gênero *Aedes*, especificamente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (HOLMES & TWIDDY, 2003).

O modelo de desenvolvimento encontrado em países endêmicos para a doença, especialmente nas áreas urbanas, é um dos principais fatores que fazem da doença um grave problema de saúde pública. Suprimentos de água potável e de serviços de saneamento inadequados levaram a um aumento na reprodução dos mosquitos transmissores (Rigau-Perez, 1998). A grande concentração de humanos

susceptíveis à infecção em proximidade aos mosquitos favorece dispersão do vírus nos dois hospedeiros. O aumento da circulação de pessoas, o desenvolvimento dos meios de transporte modernos e a negligência nas políticas de controle dos vetores são outros fatores apontados para a disseminação da doença (Rigau-Perez, 2006).

O ciclo de transmissão do vírus da dengue tem início a partir da picada do mosquito em uma pessoa contaminada, onde o vírus presente na circulação é ingerido pelo artrópode (Whitehead *et al.*, 2007) (Figura 3).



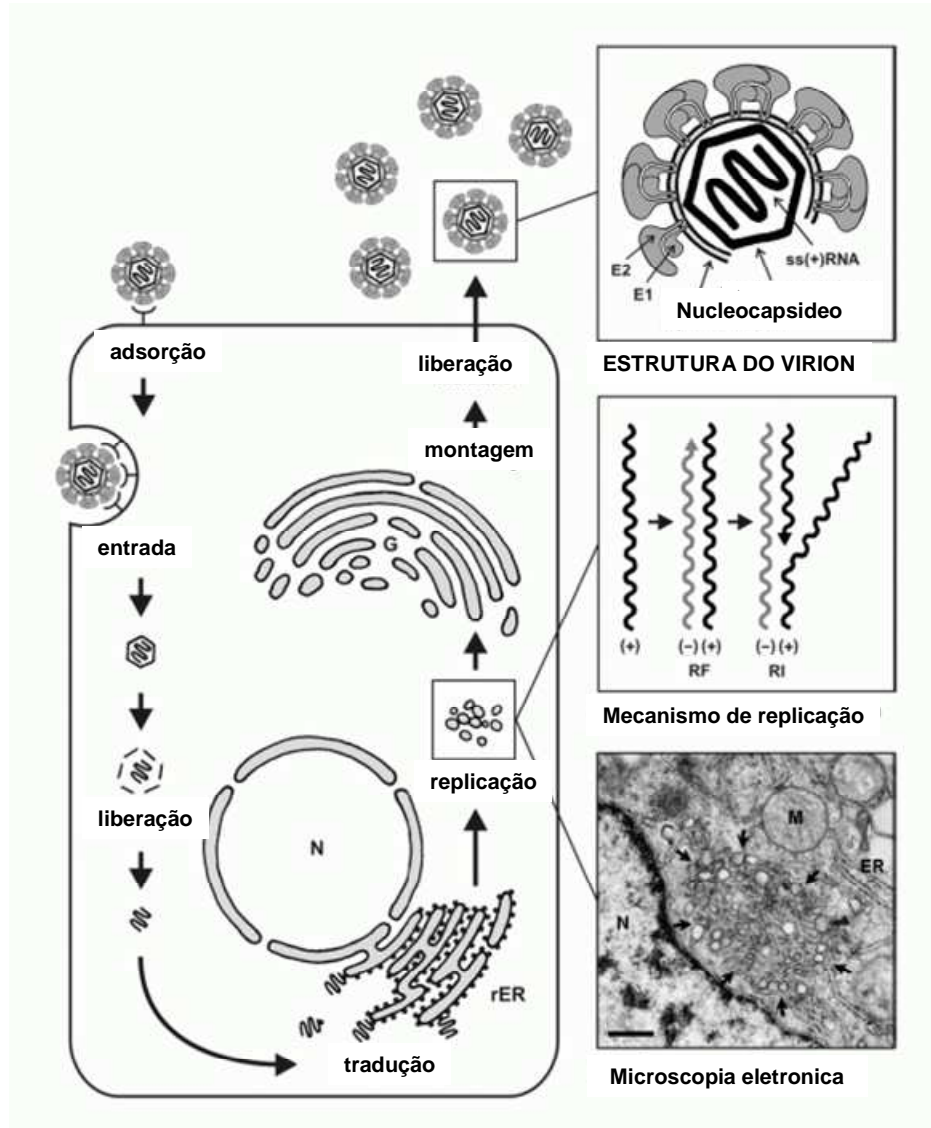
**Figura 3: Transmissão do vírus da Dengue.** Devido à alta viremia resultante da infecção pelo vírus da Dengue em humanos, os vírus são eficientemente transmitidos entre mosquitos e humanos, sem necessidade de outro hospedeiro para amplificação. O vírus é disseminado especialmente pelo mosquito *Aedes aegypti*. Um ciclo silvestre também é descrito para o vírus no oeste africano e sudoeste asiático. Modificado de (Whitehead *et al.*, 2007).

Uma vez presente no mosquito, o vírus se multiplica no intestino médio e, após algum tempo, são encontrados vírus também no ovário, sistema nervoso e nas glândulas salivares, local este por onde o vírus é passível de transmissão. Uma vez na circulação sanguínea de um novo hospedeiro o vírus passa a se multiplicar em células permissivas de órgãos específicos, como baço, fígado e tecidos linfáticos.

### 1.2.1. Interações com o hospedeiro

O vírus da Dengue tem tropismo por um amplo espectro de células humanas e o principal alvo da infecção pelo vírus ainda é controverso. Há um consenso geral de que células da linhagem fagocítica mononuclear (células dendríticas, monócitos/macrófagos, células de Langerhans) são os alvos primários (Clyde *et al.*, 2006). No entanto, existem evidências de que o vírus é capaz de infectar também linfócitos B, linfócitos T, células *natural killer*, células endoteliais, hepatócitos e neurônios (Scott *et al.*, 1980; King *et al.*, 2002; Neves-Souza *et al.*, 2005; Clyde *et al.*, 2006).

O ciclo de replicação do vírus da dengue inicia-se com a ligação do vírion e sua entrada na célula hospedeira pelo processo de endocitose mediada por receptor. Vários receptores celulares distintos são candidatos a mediadores da adsorção viral, entre eles o sulfato de heparana (Chen *et al.*, 1997; Germi *et al.*, 2002), *heat shock protein* (Hsp)-70 e Hsp-90 (Reyes-Del Valle *et al.*, 2005), GRP78/BiP (Jindadamrongwech *et al.*, 2004), CD14 (Chen *et al.*, 1999), bem como DC-SIGN (*Dendritic cell- specific intracellular adhesion molecule 3(ICAM-3)-grabbing nonintegrin*) (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003; Tassaneetrithep *et al.*, 2003; Lozach *et al.*, 2005), LSIGN (*liver/lymph node- specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*) (Tassaneetrithep *et al.*, 2003) e o receptor para manose (Miller *et al.*, 2008). Após internalização e acidificação do endossoma ocorre a fusão da membrana vesicular com a membrana viral, permitindo a passagem do nucleocapsídeo viral para o citoplasma e a liberação do genoma do vírus. A tradução do genoma é então conduzida e é seguida pela síntese de uma fita de RNA de sentido negativo. Esta fita intermediária serve como molde para a produção de múltiplas cópias da fita do RNA viral, de sentido positivo. Após vários ciclos de tradução, níveis elevados das proteínas “Cerne” (C, do inglês “core”), “Pré-envoltório” (prM) e “Capsídeo” (E) são sintetizadas. Estas proteínas são arranjadas juntamente com o RNA viral, dando origem à progênie de vírions, que é transportada pelo complexo de Golgi e secretada (CLYDE *et al.*, 2006). A duração deste ciclo pode variar de quatro a sete dias, período que coincide com o aparecimento dos primeiros sintomas na infecção humana (Figura 4).



**Figura 4. Esquema simplificado para a replicação de um flavivírus na célula do hospedeiro.** Iniciando-se com o processo de adsorção na membrana do hospedeiro, observamos a internalização e acidificação do endossoma (entrada), fusão da membrana vesicular com a membrana viral, liberação do nucleocapsídeo viral para o citoplasma e a liberação do genoma do vírus. A tradução do genoma é então conduzida no rER (retículo endoplasmático), seguida pela síntese de uma fita de RNA de sentido negativo. Esta fita intermediária serve como molde para a produção de múltiplas cópias da fita do RNA viral, de sentido positivo (replicação). Após vários ciclos de tradução, níveis elevados das proteínas estruturais são sintetizadas. Estas proteínas são arranjadas juntamente com o RNA viral, dando origem à progênie de vírions, que é transportada pelo complexo de Golgi e secretada (montagem e liberação). **À direita:** Estrutura básica de um vírion, mecanismo de replicação do RNA e microscopia eletrônica mostrando a replicação viral intracelular. Adaptado de Tan, 2006.

### **1.2.2. Manifestações da doença e modelos experimentais**

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

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

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

infecção pelo vírus é uma abordagem importante para estudo de potenciais alvos terapêuticos e vacinais.

A maioria dos modelos experimentais hoje utilizados não reproduz de maneira fidedigna as características da infecção vista em humanos (Rothman, 2003). Além de não mimetizar as características fisiopatológicas da doença humana, os modelos animais utilizados atualmente utilizam inóculos com cargas virais elevadas, o que leva a uma infecção disseminada, aparentemente inconsistente com o que é visto durante a infecção humana (Green e Rothman, 2006). Por fim, tais modelos utilizam animais com idades precoces, muitas vezes com o sistema imune ainda em período de maturação, o que impede a extrapolação das informações obtidas para infecção em indivíduos adultos, como acontece na doença humana (Rothman, 2003). Souza e colaboradores (2009) desenvolveram recentemente um modelo que reproduz as manifestações observadas nos quadros graves da doença em humanos. Trata-se de um modelo de infecção primária baseado na injeção de um isolado clínico do vírus de dengue adaptado ao hospedeiro murino. A injeção do vírus adaptado é capaz de induzir as principais manifestações características da doença humana, entre elas plaquetopenia e hemoconcentração, na maioria das vezes com fenômenos hemorrágicos e mortalidade apreciável. Além disso, camundongos infectados com o vírus adaptado desenvolvem dor inflamatória, outro sintoma marcante da patologia humana mais branda. O modelo em questão parece ser uma ferramenta interessante para o estudo da fisiopatologia da infecção pelo dengue e novos estudos têm elucidado mecanismos importantes envolvidos na progressão da doença através do presente modelo (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Assuncao-Miranda *et al.*, 2010).

### **1.2.3. As controvérsias e a infecção secundária pelo dengue**

Existem controvérsias a respeito dos mecanismos envolvidos na manifestação da forma hemorrágica da doença, seja durante uma infecção primária ou secundária. Hipóteses contrastantes têm atribuído a gravidade da doença a fatores virais e do hospedeiro (Rosen, 1977; Halstead, 1989; Rothman, 2003). Estudos recentes no Peru e Sri Lanka demonstraram a associação da forma hemorrágica da doença a determinados genótipos virais. Alguns determinantes

genéticos específicos que explicariam tal associação foram identificados (Watts *et al.*, 1999; Messer *et al.*, 2002; Messer *et al.*, 2003). Estudos ainda pouco conclusivos associam outros fatores à gravidade da doença, tais como idade, fatores genéticos e o estado nutricional do hospedeiro (Rothman, 2003). Estudos epidemiológicos têm associado a resposta imune do hospedeiro ao vírus e o desenvolvimento da forma hemorrágica da infecção. Para tal, vários mecanismos têm sido considerados, tais como deposição de complexos imunes, reação cruzada de anticorpos com endotélio vascular, intensificação da infecção mediada por anticorpos, ativação do sistema do complemento e seus produtos, liberação exacerbada de mediadores solúveis, como citocinas, dentre outros (Bokisch *et al.*, 1973; Theofilopoulos *et al.*, 1976; Halstead, 1979; Malasit, 1987; Halstead, 1989; Markoff *et al.*, 1991; Chungue *et al.*, 1994; Kurane *et al.*, 1994; Morens, 1994; Falconar, 1997; Chaturvedi *et al.*, 2000; Libraty *et al.*, 2002; Mangada *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005)

A maioria dos dados epidemiológicos tem sugerido que o desenvolvimento da FHD/SCD é mediado pela resposta imune do hospedeiro. Na Tailândia foi demonstrado que em mais de 99% dos casos de FHD os indivíduos apresentaram anticorpos heterólogos contra o sorotipo que causou a FHD (Kurane, 2007). Na epidemia de dengue ocorrida em Cuba em 1981 pelo sorotipo 2 do vírus, a maioria dos casos de FHD ocorreram naqueles indivíduos que adquiriram previamente anticorpos em outras epidemias contra o sorotipo 1 nos anos de 1977 e 1978 (Guzman *et al.*, 1990). Esses resultados sugerem que a presença de anticorpos heterólogos após a segunda infecção pelo vírus da dengue é um fator de risco importante para o desenvolvimento da FHD/SCD (Navarro-Sanchez *et al.*, 2005). Além disso, já foi demonstrado que a transferência passiva de anticorpos contra os DENV em primatas não-humanos previamente infectados foi responsável pelo aumento da viremia nestes animais. Estudos ainda mais recentes em humanos demonstram correlação positiva entre o pico da viremia e a gravidade da doença, suportando a idéia da importância do fenômeno de ADE para a patogênese. (Vaughn *et al.*, 2000; Rothman, 2004). Mais um exemplo importante que reforça essa teoria é justificado pela ocorrência de FHD durante a infecção primária pelos DENV em crianças durante o primeiro ano de vida nascidas de mães imunes aos DENV, onde essas crianças teriam adquirido anticorpos pela via transplacentária, fato que também sugere o papel *in vivo* do fenômeno de ADE nas infecções pelos DENV (Stephenson, 2005; Halstead, 2007). Além dos anticorpos de reatividade



cruzada contra outros sorotipos, alguns trabalhos têm relatado que anticorpos anti-dengue podem apresentar reação cruzada com plaquetas, fatores de coagulação e células endoteliais (Falconar, 1997). Tais anticorpos poderiam contribuir para a patogênese durante a infecção pelo dengue por causar destruição de plaquetas (Saito *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006). Anticorpos anti- NS1 também parecem se ligar a células endoteliais, levando as mesmas ao processo de apoptose (Lin *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2006). Todos estes eventos parecem favorecer o aumento da permeabilidade vascular característico da FHD/SCD.

Brevemente, essa teoria, chamada em inglês de *antibody-dependent enhancement* (ADE), sugere que os anticorpos heterólogos pré-existentes para o vírus da dengue reconhecem o novo vírus infectante e formam um complexo antígeno-anticorpo de baixa avidéz (incapaz de neutralizar o novo sorotipo), entretanto, este complexo ainda assim é capaz de interagir e ser internalizado pelos receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) de imunoglobulinas presentes na membrana celular dos leucócitos, especialmente dos monócitos e macrófagos. Esses anticorpos são denominados anticorpos sub-neutralizantes. Uma vez que o anticorpo é heterólogo e o vírus não é neutralizado, este permanece livre para se replicar dentro da maquinaria celular das células da linhagem mononuclear, especialmente. O aumento da replicação dos vírus da dengue nessas células-alvo é provavelmente responsável pelos elevados níveis de viremia nos estágios iniciais da doença, no qual também tem sido correlacionado com a maior incidência dos casos de FHD/SCD. (Gubler, 1998; Vaughn *et al.*, 2000; Rothman, 2004; Navarro-Sanchez *et al.*, 2005; Stephenson, 2005; Pang *et al.*, 2007; Kyle *et al.*, 2008; Yauch e Shresta, 2008)

### **1.3. A resposta inflamatória na infecção pelo dengue**

A inflamação é definida como uma reação secundária a lesões traumáticas, danos químicos ou físicos, de natureza auto-imune ou em resposta a agentes infecciosos, visando a restauração da estabilidade do organismo. Ela atua de forma importante como mecanismo de regulação fisiológica, conservado ao longo da história evolutiva e buscando o bem estar do indivíduo (Nathan, 2002). Este tipo de resposta do sistema imune é guiado inicialmente por componentes inatos, tais como proteínas sinalizadoras, seus receptores e alguns grupos celulares, e posteriormente

com participação de elementos da imunidade adquirida. Modificações na microcirculação, migração leucocitária através do leito vascular e liberação de moléculas solúveis nos tecidos danificados são as principais características do processo (Nathan, 2002).

### **1.3.1. Mediadores inflamatórios: citocinas e quimiocinas**

Os mediadores inflamatórios são moléculas solúveis de atuação local ou sistêmica que são liberadas ou produzidas em face a uma lesão ou estímulo. São originários do plasma, de células inflamatórias ou dos tecidos lesados, e apresentam redundância funcional. Sistemas derivados do plasma, tais como complemento, cininas e fibrinogênio, são ativados e seus produtos serão responsáveis pelos efeitos inflamatórios, assim como os produtos de células que produzem mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio, citocinas e quimiocinas (Margolius, 1995; Carroll, 1998; Nathan, 2002).

As citocinas são proteínas secretadas e possuem como função regular a resposta imune, podendo regular também o tráfego e organização celulares em órgãos linfóides. As citocinas, em geral, agem como fatores de crescimento na diferenciação e proliferação celular, e também na maturação de células na medula óssea. Algumas são quimiotáticas e possuem propriedades ativadoras e supressoras, incluindo indução da morte celular programada nos mais diversos grupos celulares que determinam a natureza da resposta imune (Borish e Steinke, 2003; Commins *et al.*, 2010). Dentre elas, destacamos algumas citocinas pró-inflamatórias clássicas, como a IL-1 $\beta$  (Interleucina-1  $\beta$ ), IL-6 e TNF- $\alpha$ , que causam modificações locais, tais como edema e exsudação, ou podem agir de forma sistêmica quando sinalizando de forma parácrina, maturando e recrutando leucócitos da medula e até desencadear febre (Nathan, 2002; Borish e Steinke, 2003; Steinke e Borish, 2006). O Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) é um mediador relacionado a respostas virais, inibindo muitas vezes sua replicação, e é produzido especialmente por linfócitos e células *Natural Killer*, atuando também na apresentação de antígeno, expressão de moléculas de MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) do tipo I e II, e estimulação da secreção de citocinas nos demais leucócitos (Borish e Steinke, 2003). Pertencentes a família das citocinas, as quimiocinas, denominadas citocinas

quimioatrativas (Murphy, 1994), desempenham um importante papel em processos inflamatórios, primeiramente por guiarem o recrutamento e ativação de leucócitos no sítio inflamatório e também por participarem dos processo de resolução e reparo (Wynn, 2008).

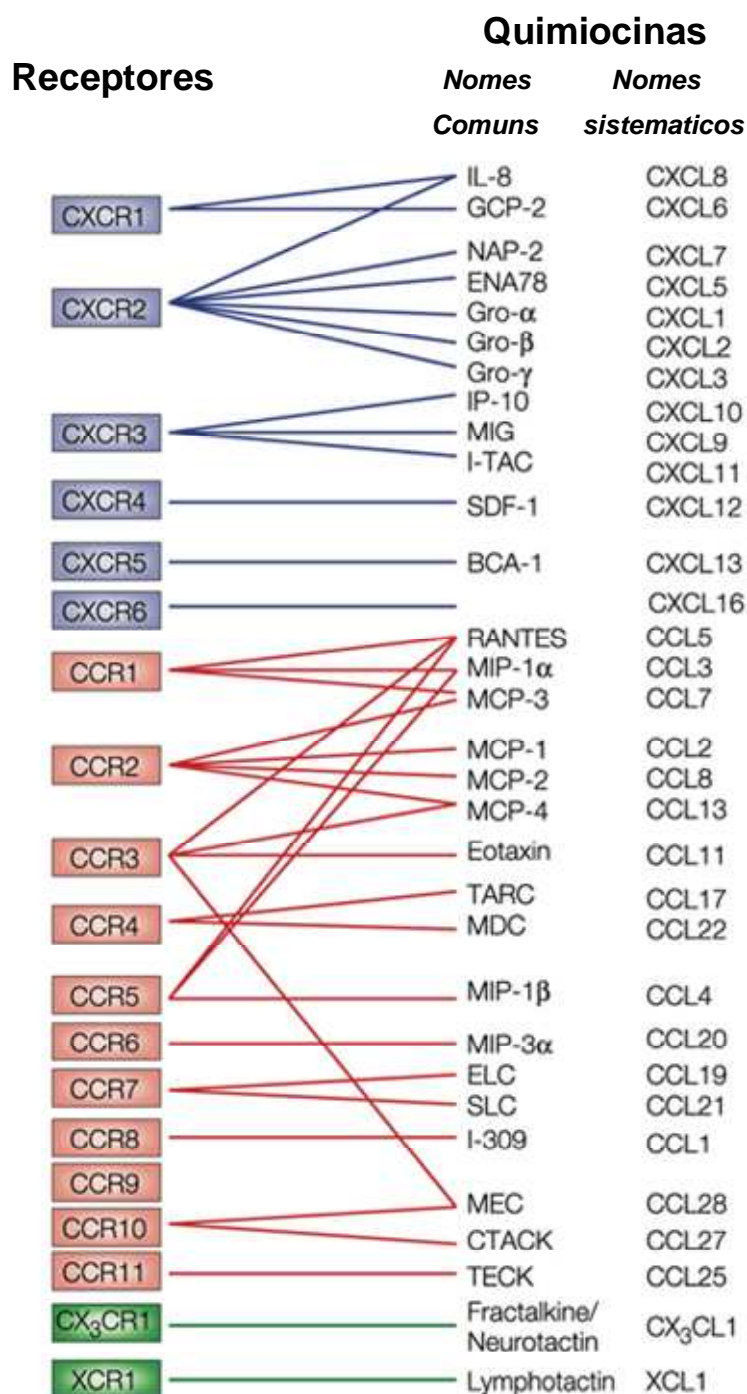
### **1.3.1.1. Citocinas e a infecção pelo dengue**

Existe uma grande produção de citocinas durante a FHD/SCD, liberadas principalmente por linfócitos T, monócitos/macrófagos e células endoteliais; e a expressão de muitos de seus receptores é encontrada no soro dos pacientes com FHD/SCD em relação aos pacientes com a forma clássica da doença (FD). As citocinas comumente encontradas em altos níveis no soro de pacientes com FHD incluem TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e várias interleucinas: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-1 $\beta$  (Chaturvedi *et al.*, 2000; Dewi *et al.*, 2004; Green e Rothman, 2006; Kurane, 2007; Pang *et al.*, 2007). As citocinas desempenham papel fundamental na imunopatogênese da infecção pelo vírus da dengue. Isto se deve especificamente ao papel pró-inflamatório que elas exercem sobre as células endoteliais. O TNF- $\alpha$  foi a primeira citocina a ser implicada na patogênese da FHD (Chaturvedi, 2006). Ela pode atuar localmente na ativação de macrófagos, entretanto a sua atividade sistêmica pode levar ao aumento da permeabilidade vascular (Clyde *et al.*, 2006; Kurane, 2007). O soro de pacientes com infecção aguda pelos DENV tem níveis aumentados de TNF- $\alpha$  (Vitarana *et al.*, 1991; Hober *et al.*, 1993; Hober *et al.*, 1996; Chaturvedi *et al.*, 2000; Chaturvedi, 2006). A associação de TNF- $\alpha$  com as manifestações mais graves da doença é também confirmada por diferentes modelos animais (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Shresta *et al.*, 2006) e por estudos *in vitro* (Dewi *et al.*, 2004; Chua *et al.*, 2005). O papel do TNF- $\alpha$  no aumento da permeabilidade vascular das células endoteliais já é bem conhecido. Além disso, o TNF- $\alpha$  é capaz de induzir a liberação de uma gama de outras citocinas e quimiocinas com atividade pró-inflamatória (Dewi *et al.*, 2004).

### 1.3.1.2. Quimiocinas: função e estrutura

Quimiocinas são grupos de moléculas relativamente pequenas (8 a 12 kDa) pertencentes a classe das citocinas, as quais exercem importante papel na biologia dos leucócitos, uma vez que controlam atividades de recrutamento e de ativação nos estados basal e inflamatório, guiando e direcionando os movimentos dos leucócitos (Luster, 1998). Além disso, outros tipos celulares, incluindo células epiteliais, endoteliais, do músculo liso e parênquimais, sofrem ação das quimiocinas (Mantovani, 1999; Locati *et al.*, 2002). São atribuídas às quimiocinas e seus receptores as propriedades de haptotaxia de leucócitos, controle da proliferação, embriogênese. Durante um processo patofisiológico, as quimiocinas contribuem para angiogênese, recrutamento e transmigração de leucócitos, remodelamento vascular e tecidual, eliminação de patógenos, apresentação de antígenos, cronificação da inflamação e reparo/cicatrização de tecidos, fibrose, tumorigênese e também são co-receptores para HIV (Murphy, 1994; Locati e Murphy, 1999; Mantovani, 1999; Locati *et al.*, 2002; Rosenkilde e Schwartz, 2004; Dorner *et al.*, 2009). Desta forma, quimiocinas são consideradas importantes tanto na homeostase quanto na patogênese de doenças.

O sistema de quimiocinas em mamíferos é complexo, compreendendo cerca de 50 ligantes, constitutivos ou induzidos, e 20 receptores de sete domínios transmembranares pertencentes à classe A dos receptores acoplados a proteína G (GPCR) do tipo *rhodopsin-like* (Thelen e Stein, 2008). As quimiocinas são consideravelmente promíscuas quanto à ativação de receptores (Figura 5). Neste sistema encontramos uma redundância funcional: a maioria dos receptores interage com vários ligantes e a maioria das quimiocinas interage com mais de um receptor (Mantovani, 1999). Atualmente são conhecidas 28 quimiocinas CC (CCL1-28), 16 quimiocinas CXC (CXCL1-16), duas quimiocinas C (XCL1-2), uma CX3C (CX3CL1) e uma C6C (CCL21) que interagem com 10 receptores CC (CCR1-10), seis receptores CXC (CXCR1-6), um receptor XC (XCR1) e um receptor CX3C (CX3CR1), respectivamente (Locati *et al.*, 2002); alguns receptores não possuem ligantes conhecidos e são classificados como sendo do tipo órfão. Os receptores de quimiocinas são estruturalmente relacionadas e sub-classificados de acordo com a posição relativa dos resíduos de cisteína conservados.



**Figura 5. Quimiocinas e seus receptores.** Estão representados no esquema (a direita), classificadas por seus nomes comuns e sistematicos, as quimiocinas das famílias CC (CCL1-28), CXC (CXCL1-16), C (XCL1-2) e CX3C (CX3CL1) que interagem com 10 receptores, representado a direita, sendo CC (CCR1-10), seis receptores CXC (CXCR1-6), um receptor XC (XCR1) e um receptor CX3C (CX3CR1). Adaptado de (Proudfoot, 2002).

Os membros do grupo de quimiocinas mais numeroso, CC ou a subfamília de quimiocinas- $\beta$ , tem as primeiras duas cisteínas adjacentes. As 28 quimiocinas que compõem esse grupo (CCL1-CCL28) interagem com 10 receptores (CCR1-CCR10), sendo que um mesmo receptor pode interagir com mais de uma quimiocina e uma mesma quimiocina pode se ligar com alta afinidade a mais de um tipo de receptor desta classe (Mantovani, 1999; Locati *et al.*, 2002).

As quimiocinas são peptídeos que tem afinidade de ligação a heparanas sulfatadas, heparina e glicosaminoglicanas na matriz extracelular, que servem de sítio de ancoragem destes mediadores e possuem a capacidade de criar um gradiente de quimiocinas essencial para o processo de haptotaxia (Proudfoot *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004). Durante um processo inflamatório, várias proteases, tais como serino-proteases, metaloproteinases e dipeptidil peptidases, regulam a atividade biológicas das quimiocinas. Através de clivagem estas são liberadas de seus sítios de fixação na matriz, de forma a criar um gradiente de concentração causado pela sua solubilização, podendo também se tornar ativas ou inativas, ou mudar funcionalmente de agonistas para antagonistas de seus receptores (Allen *et al.*, 2007). Quimiocinas também agem naturalmente como antagonistas de receptores de sua mesma classe, independente de clivagem. Como exemplo, podemos citar alguns agonistas de receptores do tipo CXCR, que exercem funções como antagonistas de receptores CCR. Desta forma, uma quimiocina é agonista de seu respectivo receptor, mas exibe capacidade inibitória de outros receptores de quimiocinas, impedindo ou competindo pela ligação (Ogilvie *et al.*, 2001; Ogilvie *et al.*, 2003).

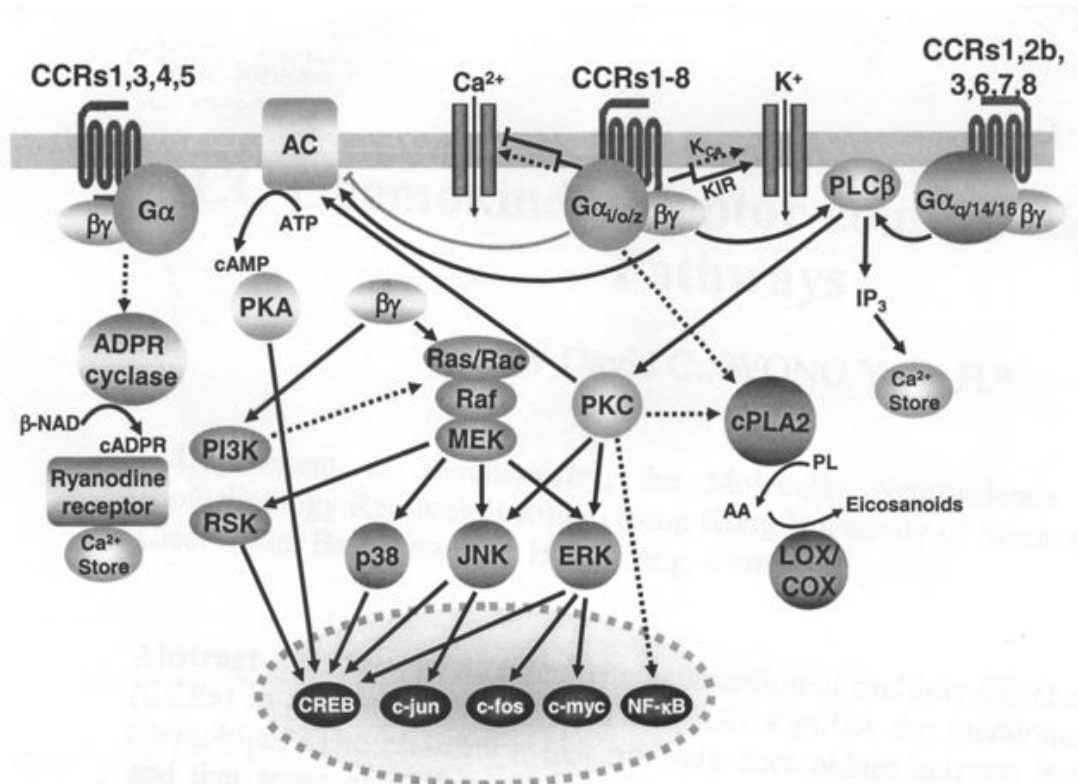
Como visto na Figura 6, o domínio de interação dos receptores de quimiocinas consiste em três voltas extracelulares e uma porção amino-terminal, que se unem para ligar ao núcleo da quimiocina ligante (Allen *et al.*, 2007). A sinalização mediada pela formação do complexo quimiocina:receptor causa uma mudança conformacional na estrutura terciária deste receptor e subsequente endocitose, que dispara sinais de ativação intracelulares. A dissociação das subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$  causada pela sinalização do receptor de quimiocinas disparam a ativação de adenilato ciclase, fosfolipase- $C\beta$ , PI3K, GTPases pequenas e canais iônicos, que levam ao aumento dos níveis de AMP (adenosina monofosfato) cíclico, inositol trifosfato (IP3) e cálcio intracelular, alterando o estado de ativação celular (Murphy, 1994). Dentre estas alterações encontramos a polimerização de filamentos de actina

e polarização celular, aumento da capacidade fagocítica e aumento da sobrevivência celular, translocação de NF- $\kappa$ B e transcrição de genes pró-inflamatórios, com aumento de produção de quimiocinas e expressão de seus receptores *de novo* (Mantovani, 1999; Allen *et al.*, 2007; Thelen e Stein, 2008).

A interação da quimiocina com seu receptor, além de ativar as vias de sinalização intracelular leva à modificação de vacúolos e organelas citoplasmáticas, necessária para duas funções básicas: (i) reciclagem de receptores, e (ii) degradação de quimiocinas e receptores. Estas duas funções são de extrema importância para a regulação dos níveis de receptores na membrana, conferindo capacidade regulatória sobre a atividade celular e, também, como mecanismo de controle pós-transcricional dos níveis de quimiocinas pela sua atividade como *scavenger* natural, tanto em condições patológicas como homeostáticas, respectivamente (Mantovani *et al.*, 2006; Cardona *et al.*, 2008; Mantovani e Locati, 2008). Após a ligação da molécula com seu receptor, este é internalizado rapidamente via endocitose mediada por clatrina, associada principalmente a duas moléculas adaptadoras, adaptina 2 (AP-2) e B-arrestina, em um processo dependente de GTPases pequenas. Então, os complexos quimiocina:receptor são dissociados pela acidificação dos endossomas, que se fundem aos lisossomos imaturos (*early*) onde as quimiocinas são degradadas pela ação do baixo pH destas vesículas. Posteriormente, os receptores são ubiquitinados e degradados nos lisossomos maduros (*late*). Alternativamente, os endossomos ácidos contendo receptores se fundem ao retículo endoplasmático com posterior fusão com a membrana celular, completando a reciclagem do receptor. Várias modificações nos receptores, tais como nas quimiocinas, também alteram a citrulinização, palmitolação, sulfatação e glicosilação, interferindo na sua sinalização, tráfego e reciclagem (Neel *et al.*, 2005; Marchese, 2009)

Os receptores de quimiocinas estão distribuídos na superfície celular e funcionam como sensores do meio externo atuando de forma dinâmica, quando transmitem sinais químicos extracelulares até o seu núcleo. Precisamente, estão localizados em "lipid rafts", que são micelas flutuantes de colesterol presentes na membrana celular, importantes para o processo de oligodimerização de receptores, tanto na forma homodímera como heterodímeros, contribuindo para uma alteração da estrutura quaternária destes. A mudança estrutural atribui novas propriedades funcionais como co-internalização e até dessensibilização cruzada do receptor. Da

mesma forma, quimiocinas se homo- ou hetero-oligomerizam de forma natural nos organismos quando presentes em altas concentrações, potencializando suas atividades sobre seus receptores (Thelen e Stein, 2008; Thelen *et al.*, 2010).



**Figura 6. Receptores para quimiocinas CC e sua sinalização.** O presente esquema mostra como os receptores para quimiocinas, neste caso da família CC, são agrupados de acordo com sua especificidade relacionada ao tipo de interação entre proteínas G. O esquema identifica as subunidades heterotrimericas das proteínas G normalmente relacionadas a diversos receptores de quimiocinas da família CC, assim como as vias de sinalização comuns a maioria dos tipos celulares relacionados à resposta inflamatória. As linhas pontilhadas indicam alguns mecanismos de ativação onde proteínas envolvidas ainda não foram completamente identificadas. Varias vias de sinalização e proteínas, incluindo MAP quinases, JNK e ERK, e fatores de transcrição como NFκB, estão envolvidos na produção, por exemplo, de citocinas e quimiocinas em respostas a patógenos e outros estímulos (New e Wong, 2003).



### 1.3.1.3. Quimiocinas da família CC e infecções virais

Além de constituir o grupo mais numeroso de quimiocinas e de possuir um amplo espectro de funções na resposta inflamatória, diversas evidências experimentais e epidemiológicas sugerem um importante papel para as quimiocinas CC e seus receptores em infecções virais. Dentre as fisiopatologias mais estudadas, e intimamente ligadas com o sistema de quimiocinas, se encontram as infecções pelo HIV (vírus da Imunodeficiência humana), pelo WNV e pelo HCV (vírus da hepatite C).

O HIV usa moléculas de membrana como o CD4 e os receptores para quimiocinas CCR5 e CXCR4 para invadir a célula do hospedeiro. Os linfócitos T, macrófagos, células dendríticas e outras células apresentadoras de antígenos expressam a molécula CD4 primariamente. As células de Langerhans ou monócitos/macrófagos expressam o co-receptor CCR5 de quimiocinas e permitem a infecção por cepas com tropismo por monócitos (*M-Tropic*). Já os linfócitos T CD4+ expressam o co-receptor CXCR4, que se liga somente em cepas virais com tropismo para células T (*T-Tropic*). As células T CD4+ primárias possuem ambos co-receptores (CCR5 e CXCR4), podendo ser infectadas tanto pelas cepas virais M quanto T (Fauci, 1996; Moriuchi *et al.*, 1996). A afinidade do HIV-1 a co-receptores específicos é um fator determinante para o tropismo celular das diferentes cepas do vírus. A importância fisiopatológica destes co-receptores é demonstrada pelo fato de que indivíduos que possuem mutações nos genes *ccr5* e *cxcr4* são resistentes à infecção pelo HIV-1 (Harouse, Bhat, *et al.*, 1991; Harouse, Laughlin, *et al.*, 1991), talvez porque estes co-receptores se ligam às quimiocinas controladoras da ativação e migração de vários leucócitos aos sítios de infecção.

O WNV induz febre e, menos comumente, complicações neurológicas, incluindo encefalite, que é o alvo dos modelos experimentais em uso. Em camundongos observa-se o recrutamento maciço de células B, T (CD8+ e  $\gamma\delta$ ), células NK, além de macrófagos. Dentre as moléculas mais estudadas nestes modelos estão o receptor CCR5 e seus ligantes CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  e CCL5/RANTES. O receptor CCR1, o qual compartilha ligantes com o CCR5, também tem sua expressão aumentada. Os receptores CCR2 e CCR3 parecem ser os menos proeminentes. Camundongos KO para estes receptores de quimiocinas mostram graus diferentes de susceptibilidade, sendo que o animal CCR5 KO é o

mais susceptível deles, uma vez que o receptor CCR5, na infecção por WNV é quem regula o recrutamento leucocitário para o SNC. Aproximadamente 20% dos linfócitos T, células NK e macrófagos presentes no SNC de animais infectados por WNV expressam CCR5. O uso de anticorpos anti-quimiocinas ligantes de CCR5, 1 ou 3 também levam a um fenótipo similar ao dos animais CCR5 KO, demonstrando que o sistema de quimiocinas rege a infecção viral em nível de receptor e ligante (Glass *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2010). A função do CCR5, e receptores para quimiocinas associados, parecem mediar diretamente o *clearance* viral e a progressão da doença do que modular a resposta imune de forma indireta, como em outros modelos experimentais de infecção viral ou por outro microrganismo (Klein e Diamond, 2008).

O recrutamento de células T para o fígado na infecção pelo HCV é um passo essencial para a eliminação do vírus. O movimento leucocitário a favor do gradiente de quimiocinas e a expressão seletiva de receptores para quimiocinas em células T são eventos chave no processo de recrutamento na infecção por HCV. Lichterfeld e colaboradores (2002) demonstraram a diminuição na expressão do receptor CCR5 na superfície de células CD4+ e CD8+ de pacientes com HCV, resultando em um menor recrutamento de leucócitos em resposta a CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  e CCL5/RANTES. O mecanismo pelo qual o HCV interfere na expressão de CCR5 parece ser resultante da interação de proteínas virais com receptores de membrana, como CD81 (Nattermann *et al.*, 2004; Nattermann *et al.*, 2006). CCL5/RANTES, em face da *downregulation* de CCR5 por interação por interação proteína viral-CD81, tem sua produção aumentada e parece potencializar a internalização de mais receptores CCR5, e também CCR1 e CCR3, uma vez que é capaz de se ligar a estes dois receptores. CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP-1 $\beta$  parecem não contribuir para este fenômeno. Este mecanismo leva a deficiência de recrutamento leucocitário para órgãos alvo, o que favorece a proliferação viral e a cronificação da doença (Lichterfeld *et al.*, 2002; Ajuebor *et al.*, 2004).

#### **1.3.1.4. Quimiocinas na resposta a infecção pelo dengue**

Estudos clínicos recentes têm sugerido um papel fundamental para citocinas na patogênese da FHD (Rothman, 2003; Navarro-Sanchez *et al.*, 2005; Green e

Rothman, 2006). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 têm sido especialmente associadas com a severidade da doença, sendo considerados marcadores de ativação e severidade da infecção. Embora o sistema de citocinas/quimiocinas seja complexo e mal elucidado no contexto da infecção pelo vírus da dengue, estas moléculas parecem representar marcadores interessantes para a triagem de pacientes e para o prognóstico da doença. O interesse em definir marcadores e elucidar sua associação com os eventos que culminam no quadro grave da infecção pode levar a futuras estratégias terapêuticas e atenuar o impacto social e econômico da doença nas regiões mais afetadas. Nestes termos, quimiocinas e citocinas já têm sido usadas como marcadores em doenças como a hepatite C, ARDS (Síndrome da Angústia Respiratória Adulta) e sepse (Bouros *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2005; Bozza *et al.*, 2007).

No que diz respeito à quimiocinas, a carência de modelos experimentais e a variabilidade de cepas virais controladas para estudo não permitiram até o momento a caracterização satisfatória do sistema de quimiocinas na infecção por este vírus. Alguns estudos com amostras de pacientes apresentado tanto FD como FHD têm sido feitos em busca de correlações que ajudem a entender a fisiopatologia em termos celulares e moleculares. Já existem alguns trabalhos demonstrando o papel da quimiocina MCP-1/CCL2 e MIP-1 $\alpha$ / CCL3 na infecção pelo dengue. Estas quimiocinas são capazes de recrutar monócitos, linfócitos T e células *natural killer*, sendo estas envolvidas na fisiopatologia da infecção. Elas são capazes também, quando produzidas em grandes concentrações, de atuar em células endoteliais causando permeabilidade vascular e contribuindo para o extravasamento de plasma, evento crítico na FHD (Stamatovic *et al.*, 2003; Deshmane *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos envolvendo MCP-1/CCL2 e MIP-1 $\alpha$ / CCL3 em dengue estão focados na ação destas quimiocinas em células endoteliais, o que levaria a redução das junções entre estas células, facilitando o fenômeno de extravasamento. Entretanto, a função destas quimiocinas é provavelmente subestimada. Pouco se sabe sobre os tipos celulares envolvidos nesta produção e a cinética de aparecimento destas moléculas quando correlacionada com a severidade da doença. Sierra e colaboradores (2010) demonstraram de forma importante que MCP-1/CCL2 e MIP-1 $\alpha$ / CCL3 possuem um papel importante na resposta inicial a infecção em estudos de ADE *ex vivo*, onde estas quimiocinas são produzidas em altos níveis em pacientes imunizados com DENV-1 e DENV-3, o que coincide com a

produção maciça de TNF-  $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Sierra *et al.*, 2010). Desta forma, os autores sugerem que uma re-infecção com diferente sorotipo do vírus parece contribuir para uma maior produção destas quimiocinas do que o observado na infecção primária. Além do mais, linfócitos T CD4+ e CD8+, incluindo células T de memória, são capazes de produzir tanto MCP-1/CCL2 como MIP-1 $\alpha$ / CCL3 após re-estimulação (Riley *et al.*, 1998; Yang e Mosmann, 2004). CCL2 e CCL3 podem estar associados então a uma expansão preferencial de células de T de memória com reatividade cruzada a determinados sorotipos, o que tem sido atribuído como importante fator para a FHD, onde estes pacientes apresentam ativação de células T bastante aumentada em comparação a pacientes com FD. Este fenótipo é associado ao aumento significativo de TNF-  $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Kalayanarooj *et al.*, 1997; Rothman, 2003; 2004; Green e Rothman, 2006).

MCP-1/CCL2 tem seus efeitos mediados pelo receptor CCR2. O papel pró-inflamatório de CCR2 depende basicamente de sua expressão em APCs (células apresentadoras de antígeno) e em células T (Deshmane *et al.*, 2009). A superexpressão de MCP-1/CCL2 induzida pelo DENV em pacientes é transiente e sistêmica quando comparada a doenças crônicas. Avirutnan e colaboradores (1998) foram os primeiros a demonstrar a superexpressão de CCL2 no soro de pacientes com dengue. Lee e colaboradores (2006) demonstraram que a expressão de CCL2 em pacientes com FHD é muito maior do que a observada em pacientes com FD. Lin e colaboradores (2005) demonstraram de forma interessante que o anticorpo anti-DENV NS1 se liga a células endoteliais vasculares e induz a expressão de CCL2, o que leva a expressão de ICAM-1 e a uma maior adesão de leucócitos ao endotélio. Entretanto os autores não demonstraram se MCP-1/CCL2 produzido por monócitos infectados são capazes de estimular a expressão de moléculas de adesão e contribuir para a inflamação no contexto de recrutamento e ativação de leucócitos.

Em conjunto, os estudos acerca de CCL2 e CCL3 ainda estão bastante restritos a fenômenos vasculares pontuais e a ativação de tipos celulares em situações não naturais. Entretanto estes dados já sugerem que a produção inicial, especialmente de MCP-1/CCL2, parece contribuir de forma importante para o fenômeno de extravasamento vascular observado na FHD (Avirutnan *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Sierra *et al.*, 2010)

RANTES/CCL5 (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) é uma quimiocina ligante dos receptores CCR1 e CCR5 com atividade quimiotática para linfócitos T, monócitos, células NK, entre outras (Schall *et al.*, 1990). Algumas infecções causadas por vírus podem levar a expressão de CCL5 em uma grande variedade de células (Avirutnan *et al.*, 1998; Matsukura *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1998), sendo que a expressão de CCL5 parece ser um evento importante na resposta do hospedeiro a infecções.

Lin e colaboradores (2005) encontraram uma importante correlação entre a produção de RANTES/CCL5 em células hepáticas e a infecção pelo dengue. De forma interessante, esta produção parece estar intimamente associada à ativação de vias de estresse oxidativo e com a produção de IL-6, ambos importantes mediadores da resposta inflamatória e comumente associados ao choque. Entretanto, a relação entre a produção de CCL5 e os níveis de transaminases hepáticas, marcadores de lesão, não está correlacionada, sugerindo que níveis elevados de RANTES/CCL5 não podem ser diretamente correlacionados com disfunção ou lesão hepática. Hepatócitos parecem ser grandes produtores de RANTES/CCL5, e apesar desta correlação não estar estabelecida, a quimiocina parece mediar outros eventos, como por exemplo, o recrutamento e ativação de leucócitos durante a infecção, favorecendo a perpetuação da resposta inflamatória (Lin *et al.*, 2000; King *et al.*, 2002; Glass *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005; Conceicao *et al.*, 2010). Assim como MCP-1/CCL2, a literatura para RANTES/CCL5 na infecção pelo DENV permanece pouco fundamentada.

Dentre os mais importantes eventos do processo inflamatório em doenças infecciosas podemos citar o recrutamento, acúmulo e ativação de leucócitos em órgãos alvo, onde contribuem para a produção de citocinas/quimiocinas e para eventual lesão tecidual. Evento este que se retro-alimenta e contribui muitas vezes para a morte do hospedeiro em função de uma exacerbação da resposta contra o patógeno. Não existem estudos em dengue onde se correlaciona eventos essenciais como a produção de mediadores inflamatórios (citocinas/quimiocinas), o papel de seus respectivos receptores e seus efeitos em determinados tipos celulares. Células T CD4, CD8 e NK têm sido sugeridas como fundamentais na infecção pelo vírus da dengue (Liu *et al.*, 2002; Shresta, Kyle, Robert Beatty, *et al.*, 2004; Shresta, Kyle, Snider, *et al.*, 2004; Chau *et al.*, 2008). Entretanto, estudos restritos a amostras de pacientes e modelos experimentais em camundongos imunodeficientes levam a

conclusões um tanto quanto precipitadas se colocarmos a infecção pelo dengue em um contexto maior, como por exemplo, quando comparada a outras infecções melhor estabelecidas, como HCV ou WNV.

A carência de modelos experimentais apropriados assim como a escassez de literatura contundente envolvendo pacientes torna urgente este tipo de estudo. Uma estruturação um pouco mais elaborada de tipos celulares e mediadores chave envolvidos na infecção pelo dengue contribuiria para tanto para a compreensão da fisiopatologia como para o estudo de drogas capazes de reduzir os sintomas e manifestações das formas graves da doença.

## **1.4. Células NKT invariáveis (iNKT)**

### **1.4.1. Definição e distribuição**

As células iNKT fazem parte de um subtipo único de linfócitos T e apresentam um fenótipo híbrido de células NK e células T convencionais. Por esta razão, uma origem tímica e extra- tímica para células NKT tem sido sugeridas (Levitsky *et al.*, 1991; Makino *et al.*, 1996). No entanto, existem poucas evidências de que a via extra-tímica possui um papel fundamental no desenvolvimento de células NKT. iNKTs expressam a lectina do tipo c CD161 (também conhecida como NK1.1 e encontrada em algumas linhagens de camundongos) além de um TCR invariante. Embora a maioria das células NKT pertença às populações CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (duplo-negativas) ou CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, um subtipo destas células caracterizadas como CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> são encontrados em humanos (Cerundolo *et al.*, 2009; Yuling *et al.*, 2009).

Células NKT são geralmente divididas em dois subtipos: tipo I e tipo II (Swain, 2008). A maioria das células NKT pertence ao tipo I e expressam um TCR invariante ao contrario de células T convencionais, vindo daí a sua classificação como "iNKT". Diversas evidências bastantes consistentes levantadas na ultima década ressaltam a importância destas células em respostas imunes contra diversos agentes infecciosos. Por outro lado, células NKT do tipo II, também conhecidas como vNKT (não-clássicas ou não-invariantes) expressam um repertório mais diversificado de TCR, e seu papel na regulação ou ativação da resposta imune são ainda pouco estudados (Ambrosino *et al.*, 2007; Halder *et al.*, 2007; Arrenberg *et al.*, 2009).

No que diz respeito a sua distribuição, as células iNKT são encontradas em pequeno número no timo, baço, medula óssea, sangue e linfonodos. E ao contrario do encontrado em outros tecidos, células iNKT de camundongos são encontradas em abundância no fígado (representam 40% dos linfócitos intra-hepáticos) (Eberl *et al.*, 1999). Este número está reduzido para aproximadamente 12% no fígado de humanos (Swain, 2008).

Em camundongos, as células iNKT expressam um rearranjo V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 com uma região invariante CDR3 que é tipicamente co-expressa com cada uma das mais diversas cadeias V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 2 ou V $\beta$ 7. Em humanos, as células iNKT expressam um rearranjo invariante V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 com V $\beta$ 11, que são os ortólogos humanos de V $\alpha$ 14 e V $\beta$ 8 presentes em camundongos, respectivamente (Kronenberg, 2005). Os TCRs de células iNKT reconhecem tipicamente antígenos de estrutura glicolipídica, apresentados através de moléculas CD1d presentes em APCs como células dendríticas (DCs), macrófagos e células B. Após apresentação via APCs e estímulo de seu TCR, as células iNKT são ativadas e produzem grandes concentrações de citocinas do tipo Th1 (i.e. IFN- $\gamma$ ) e/ou do tipo Th2 (i.e. IL-4). A sua importância na regulação da resposta imune e na prevenção de doenças auto-imunes já é conhecida (Sharif *et al.*, 2001; Sharif *et al.*, 2002; Wu e Van Kaer, 2009). Além de seus papéis imunoregulatórios, as células iNKT participam de forma importante no reconhecimento e resposta em infecções microbianas (Kinjo *et al.*, 2005).

#### **1.4.2. A molécula CD1d**

Logo após a síntese no retículo endoplasmático (RE), as moléculas CD1d se ligam a fosfolípidos endógenos que facilitam a saída do RE e seu transporte para a superfície celular (Joyce e Van Kaer, 2003; Major *et al.*, 2006; Barral e Brenner, 2007). Trabalhos recentes indicam que a ligação de fosfolípidos a CD1d no RE envolvem a ação da proteína de transferência de triglicerídeo microsomal, que se trata de uma proteína de transferência de lipídios (PTL) capaz de desempenhar um importante papel na montagem da apolipoproteína B (apoB) com lipídeos no RE.

A molécula CD1d de superfície é então internalizada por endocitose mediada por clatrina, processo este que depende de um motivo baseado em tirosina presente na cauda citoplasmática da molécula CD1d. Em complemento a esta via, já foi

relatado que um subtipo de moléculas CD1d alcançam compartimentos endossomais após associação com a cadeia invariante associada ao MHC de classe II no RE. Em endossomas mais tardios, os fosfolípidos formados no RE são trocados por lipídios antigênicos que podem ativar células iNKT. Estes glicolípides podem ser derivados de fontes endógenas, como, por exemplo, o iGb3 lisossomal, ou então de fontes exógenas. Múltiplas vias podem ser acionadas para fornecer glicolípides exógenos ao compartimento de formação de CD1d: (a) fagocitose de micróbios ou seus produtos, (b) associação de manose com glicolípides através do receptor de manose, (c) associação de proteínas de baixa densidade (LDL) modificadas por receptores *scavenger*, e (d) internalização de complexos lipídicos contendo apoE (apolipoproteína E) através do receptor para LDL ou receptores para outras lipoproteínas relacionadas.

Após a sua chegada em compartimentos endossomais tardios, glicolípides endógenos ou exógenos podem passar por processamento (i.e. por hidrolases de carboidratos), seguido por sua associação com CD1d com a ajuda de uma variedade de PTLs, incluindo saposinas. Estes complexos antigênicos CD1d-glicolípides são então disponibilizados na superfície celular para o reconhecimento por células iNKT. Têm ficado claro nos últimos anos que uma grande variedade de patógenos virais, como o herpes vírus associado ao Sarcoma de Kaposii, o HIV-1, o herpes simplex-1, o vírus da estomatite vesicular e o *Vaccinia virus* podem interferir no trafico intracelular de CD1d e, desta forma, impedir a apresentação de glicolípides antigênicos às células iNKT (Van Kaer e Joyce, 2006). Além do mais, *Chlamydia trachomatis* é capaz de regular negativamente a expressão de CD1d em células epiteliais humanas através de sua degradação, utilizando tanto proteasomas celulares como clamidiais (Kawana *et al.*, 2007).

#### **1.4.3. Reconhecimento de antígenos glicolipídicos por células iNKT**

Devido a sua limitada diversidade, o TCR de células iNKT é mais associado aos receptores de reconhecimento de padrões expressos em células do sistema imune inato do que os variados receptores antígeno-específicos expressos por células da resposta imune adaptativa. Por haver uma propensão em reagir com células autólogas, tem se considerado que células iNKT reconhecem tanto



glicolípides endógenos como exógenos (Joyce *et al.*, 1998; De Silva *et al.*, 2002). O iGb3 foi o primeiro ligante endógeno de CD1d a ser identificado, o que facilitou o estudo da ativação de células iNKT na ausência de um lipídeo antigênico, neste caso utilizando um camundongo deficiente em iGb3 ( $\text{hexB}^{-/-}$ ) (Zhou *et al.*, 2004). Entretanto, muito pouco ainda se conhece sobre os ligantes endógenos que podem ser ativadores de células iNKT. Além do mais, a importância de iGb3 como um ligante fisiológico para células iNKT é ainda bastante contestado.

Todas as células iNKT de camundongos e humanos são capazes de reagir com o  $\alpha$ Gal-Cer ( $\alpha$ -Galactosil-Ceramida) (Kawano *et al.*, 1997), um glicoesfingolípide isolado da esponja marinha *Agelas mauritanus* durante uma triagem de produtos naturais com atividade anti-metastática em camundongos. Muitos pesquisadores têm especulado que este composto pode ter se originado de microrganismos presentes na esponja (Kinjo *et al.*, 2005). O  $\alpha$ Gal-Cer é um potente agonista de células iNKT e tem sido bastante estudado, principalmente no que diz respeito a sua interação com CD1d e com a o TCR invariante de células iNKT, suas atividades imunomodulatórias e suas propriedades terapêuticas.

Como já citado, as células iNKT reconhecem glicolípides apresentados por moléculas semelhantes ao MHC-I, mas essencialmente por moléculas menos polimórficas, CD1d, presentes em APCs. O mecanismo de ligação do antígeno nos bolsos hidrofóbicos da molécula CD1d e sua interação com o TCR de células iNKT já foram descritos anteriormente em detalhes (Godfrey *et al.*, 2005).

#### **1.4.4. Vias de ativação de células iNKT**

Na maioria das respostas imunes onde células iNKT parecem estar implicadas, o mecanismo de ativação destes tipos celulares ainda é pouco compreendido (Figura 7). Estudos com patógenos microbianos têm sugerido duas vias para a ativação de células iNKT (Van Kaer e Joyce, 2005; Barral e Brenner, 2007). Na chamada “via direta”, que pode ser ativada por espécies do gênero *Novosphingobium* e por *B. burgdorferi*, onde lipídios derivados destes patógenos são associados a moléculas de CD1d em endossomas e então apresentados na superfície de APCs para reconhecimentos pelo TCR de células iNKT. Entretanto, células iNKT também podem ser ativadas por vários microrganismos que não

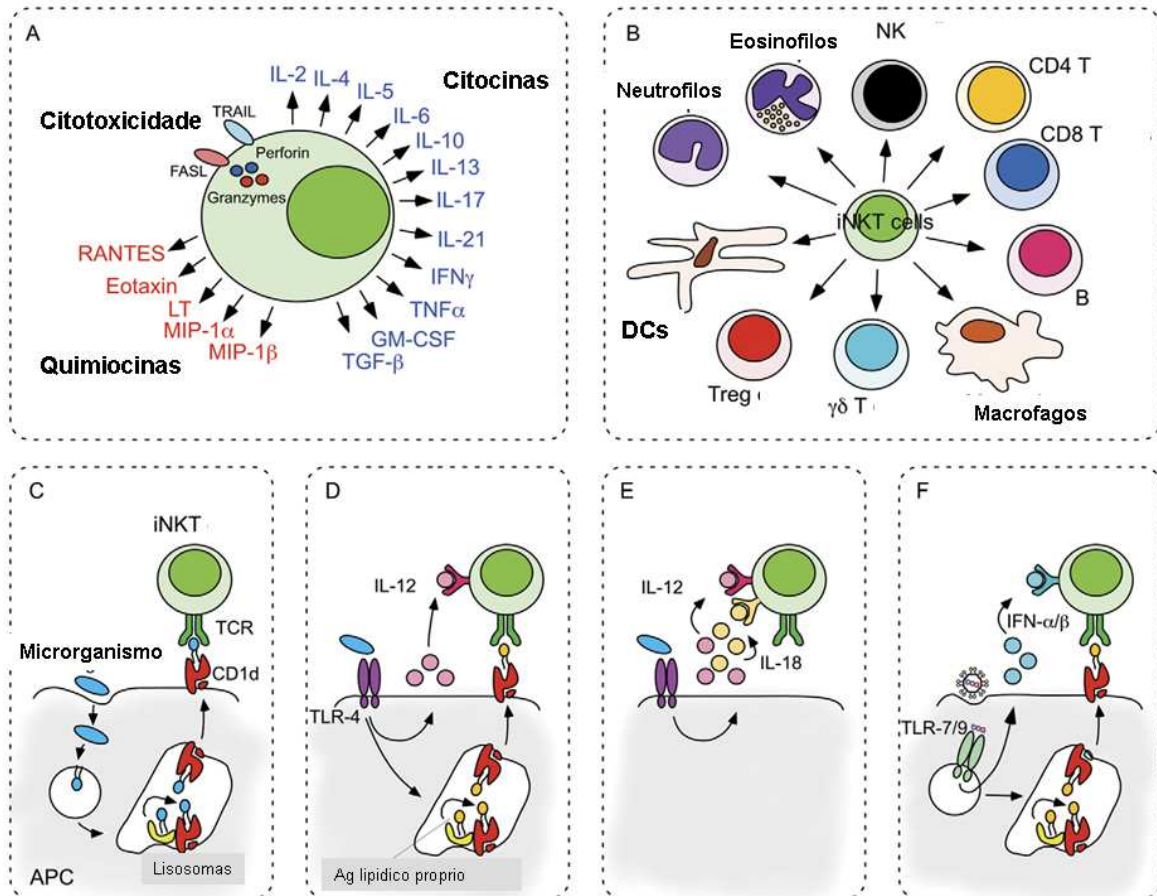
possuem antígenos a serem reconhecidos diretamente via CD1d (Tupin *et al.*, 2007). Este tipo de ativação durante infecções, assim chamada de “ativação indireta”, é geralmente mediado por citocinas.

Após a ativação de receptores de reconhecimento de padrões associados a patógenos, ou receptores do tipo TOLL (TLRs), seja na superfície da célula ou intracelulares, ocorre a ativação de cascatas de sinalização com a conseqüente ativação de fatores de transcrição e produção de citocinas. Dentre estas citocinas ativadoras de células iNKT podemos citar notadamente IL-12, IL-18 e/ou interferons (IFNs) do tipo I. Este tipo de ativação é o mais relatado em processos infecciosos (Van Kaer e Joyce, 2005). Para alguns microorganismos a ativação de células iNKT também requer a expressão de CD1d em APCs. Neste caso as citocinas parecem funcionar na amplificação da resposta, onde, por exemplo, ocorram interações de baixa afinidade entre células iNKT e o complexo CD1d/glicolípides endógenos, como o iGb3. Mecanismos similares parecem estar envolvidos em condições inflamatórias agudas e crônicas (Van Kaer e Joyce, 2005; Yu e Porcelli, 2005; Tupin *et al.*, 2007).

#### **1.4.5. Papel de células iNKT em infecções microbianas**

A descoberta de que células iNKT são ativadas diretamente pelo reconhecimento de certos glicolípides antigênicos e, subseqüentemente, produzem grandes quantidades de citocinas proporcionalmente a quantidade de células participantes da resposta, levou a investigação intensa de varias formas de antígenos lipídicos de uma variedade de espécies de microorganismos. Células iNKT parecem desempenhar um papel protetor em varias infecções, como aquelas causadas por *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Leishmania major* e *Plasmodium berghei* (Yu e Porcelli, 2005; Emoto e Emoto, 2009).

Em alguns casos, entretanto, as células iNKT parecem estar envolvidas na exacerbação da resposta inflamatória associada ao patógeno, levando a efeitos deletérios para o hospedeiro, como por exemplo, em infecções causadas por *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli* (Shimizu *et al.*, 2002; Hiromatsu *et al.*, 2003; De Lalla *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2007). A infecção por *E. coli*, por exemplo, leva a lesão hepática caracterizada por necrose, inflamação local, dano celular a hepatócitos e grande infiltrado linfocítico em camundongos selvagens.



**Figura 7. Vias de ativação propostas para células iNKT.** Células iNKT ativadas e suas diversas funções no organismo em condições patológicas estão representadas na figura. **Em A:** Células iNKT possuem uma potente atividade pró-inflamatória e são capazes de produzir uma grande diversidade de mediadores, incluindo citocinas, quimiocinas e fatores citotóxicos, como granzima B. **Em B:** Podem ativar e cooperar com diversos outros tipos celulares da imunidade inata e adquirida, dependendo do tecido e do estímulo. Diversos mecanismos para a ativação de iNKT por patógenos já foram identificados. **Em C:** Microrganismos que possuem glicolípides restritos a apresentação via CD1d (Sphingomonas, Borrelia) podem ativar diretamente células iNKT via TCR, na ausência de co-estimulação. **Em D:** Bactérias que possuem LPS (Salmonella) ativam TLR4 expresso em APCs que então podem ativar indiretamente células iNKT através da apresentação de glicolípides próprios, utilizando IL-12 como co-estimulo. **Em E:** Uma variação do citado em D, com a participação do eixo IL-12/IL-18 e CD1d-independente. **Em F:** Patógenos intracelulares podem estimular TLR7/9 para induzir a apresentação de antígenos glicolipídicos próprios, restritos a CD1d, para células iNKT. Neste caso, co-estimulação por IFN- $\alpha/\beta$  é requerida. (Matsuda *et al.*, 2008).

Estas alterações fisiopatológicas estão bastante reduzidas em camundongos  $\alpha 18^{-/-}$ , animais deficientes em células iNKT (Hiromatsu *et al.*, 2003). Além do mais, já se sabe que células iNKT intra-hepáticas, que expressam mRNA para o receptor TOLL do tipo 2 (TLR2), são ativadas *in vitro* em resposta a uma lipoproteína sintética ligante de TLR2 (Hiromatsu *et al.*, 2003). O mesmo foi relatado por Shimizu e colaboradores (2002), que demonstraram aumento de dano hepático em animais selvagens após infecção por *S. choleraesuis* em comparação com animais  $\alpha 18^{-/-}$ . Estes dados reforçam a idéia de que a lesão hepática mediada por células NKT parece ser, em parte, dependente de interações entre TLR2 e seus ligantes.

Outros tipos de receptores associados ao reconhecimento de patógenos, principalmente do tipo TOLL, são amplamente conhecidos por desencadear a ativação de vias de sinalização intracelulares e conseqüentemente a translocação de fatores de transcrição para o núcleo, o que acarreta a expressão e conseqüente produção de um amplo espectro de citocinas (Iwasaki e Medzhitov, 2004; Medzhitov, 2007). Nagarajan e Kronenberg (2007) mostraram o aumento da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por células iNKT em resposta ao LPS (Lipopolissacarídeo) de *E. coli*, um ligante de TLR4, o que é TCR-independente mas requer a produção de IL-12 e IL-18 por DCs. O mesmo grupo demonstrou que DCs primadas com um agonista de TLR9 (CpGODN) podem ativar células iNKT e leva-las à produção de IFN- $\gamma$ , um fenômeno independente de IL-12 (Tyznik *et al.*, 2008). Importante frisar que a expressão de TLR-2, -4, -5 mas não TLR9 foi demonstrado em células NKT em nível transcricional (Shimizu *et al.*, 2002). De maneira geral, estes estudos sugerem que células iNKT podem reconhecer sinais, diretos ou indiretos, gerados por interações entre TLRs e seus ligantes. Entretanto, embora exista a expressão de certos TLRs em células iNKT, não existem evidências da ativação direta destes subtipos celulares por agonistas de TLR. Estes dados reforçam a idéia de que APCs são essenciais para a transmissão de sinais associados à TLRs para células iNKT, com sua subseqüente ativação e produção de citocinas.

Todos estes estudos supracitados se tornaram possíveis com o advento de ferramentas experimentais mais adequadas, incluindo o isolamento de células iNKT e a geração de animais deficientes para este subtipo celular. Tais ferramentas abriram as portas para estudos envolvendo microrganismos mais complexos, com fisiopatologia muitas vezes pouco elucidada, o que inclui muitas infecções virais. Dois animais deficientes geneticamente têm sido utilizados no estudo de células

iNKT: o  $J\alpha 18^{-/-}$  e o  $CD1d^{-/-}$ . Como já citado, o animal  $J\alpha 18^{-/-}$  não possui células iNKT, enquanto o  $CD1d^{-/-}$  não expressa a molécula CD1d, que é necessária para a seleção positiva de células iNKT e vNKT durante o desenvolvimento tímico. Desta forma, estes animais são deficientes para estes dois tipos de células. Em alguns casos, entretanto, estes animais são responsivos a algum tipo de células T convencionais ditas “CD1d-reativas”. O estudo com anticorpos contra CD1d se torna complementar e necessário nestes casos.

#### **1.4.6. Células iNKT, TLRs e evasão**

Como se têm discutido em relação à ativação e participação de células iNKT em infecções, interações entre TLRs e padrões moleculares associados a vírus podem ser requeridos para ativação e execução da função efetora por células iNKT. Um estudo recente demonstrou que células NKT humanas são capazes de se expandirem e aumentarem a produção de IFN- $\gamma$  quando PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) são tratadas com agonistas TLR3, -7 e -9 (Raftery *et al.*, 2008). O mesmo foi também observado para PBMCs tratadas com HSV-1 inativado por luz UV. De forma importante, a depleção de células dendríticas plasmocitoides (pDCs) dentre as PBMCs reduz significativamente a ativação de células iNKT no mesmo sistema. Estes dados sugerem a importância de pDCs e de citocinas produzidas por estas células, como IFN- $\gamma$ , na ativação de células NKT. Outro dado interessante demonstra que PBMCs tratadas com LPS levam a redução da produção de IFN- $\gamma$  e o aumento da produção de IL-10, sugerindo que a interação DC-iNKT deve compreender uma regulação fina para o tipo de sinal derivado de DCs após ativação de TLRs específicos (Raftery *et al.*, 2008).

Um papel similar para pDCs e IFN- $\gamma$  na ativação de células iNKT foi demonstrado em PBMCs tratadas com um ligante de TLR9 (CpG-ODN) (Suzuki *et al.*, 2004). Tyznik e colaboradores (2009) demonstraram que a co-cultura de DCs expostas a ligantes TLR7 e -9 com células iNKT purificadas do baço de camundongos selvagens leva a uma grande produção de IFN- $\gamma$  no meio. Além do mais, a ativação de células iNKT e a produção de IFN- $\gamma$  também foram demonstradas em camundongos durante a infecção por citomegalovírus (CMV), sendo esta resposta dependente de TLR-9 e IL-12 (Raftery *et al.*, 2008).

Complementar a estas interações TLRs-vírus, é possível que antígenos virais possam ativar células iNKT diretamente através de seu TCR. Considerando que vírus não possuem nenhum antígeno lipídico, ao contrário de bactérias e protozoários, é difícil especular como se daria este tipo de interação. A melhor explicação é que, durante infecções virais, ocorreria a síntese de lipídeos endógenos, e células iNKT podem ser ativadas por estas moléculas, auxiliadas por citocinas produzidas por APCs neste microambiente. Neste panorama, células infectadas, apresentando antígenos no contexto de moléculas CD1d, podem ser alvos para a atividade citotóxica exercida por células iNKT. Um estudo recente demonstrou que um acilpeptídeo, o peptídeo dodecamérico de N-acil glicina (lipo-12), capaz de mimetizar lipoproteínas e produzido por células e vírus, pode ser apresentado por moléculas CD1c a células T humanas (Van Rhijn *et al.*, 2009). De qualquer forma a apresentação via CD1d em infecções virais, por mecanismos ainda não bem esclarecidos, não deve ser uma hipótese descartada.

Os vírus desenvolveram estratégias de evasão contra o sistema imune do hospedeiro, incluindo a já citada regulação negativa da expressão de CD1d por APCs (Van Kaer e Joyce, 2006). O exemplo melhor estudado sobre a interferência viral sobre a função de CD1d é a proteína NEF, do HIV, e a manosiltransferase, o receptor para o trifosfato de inositol e o receptor de rianodina para o Sarcoma de Kaposi (um herpes vírus), que são reconhecidamente capazes de interferir no transporte de CD1d do complexo de Golgi para a superfície assim com a endocitose de moléculas CD1d de superfície (Cho *et al.*, 2005)

#### **1.4.7. O papel de células iNKT na resposta imune em infecções virais**

No contexto da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV, um flavivirus), poucos trabalhos têm sido feitos em modelos animais da doença. Kakimi e colaboradores (2000) mostraram um aumento de mRNA para IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha/\beta$  no fígado de animais tratados com  $\alpha$ Gal-Cer, o que foi também associado com um aumento do *clearance* viral no órgão. Este efeito foi temporalmente associado com uma rápida queda de células NKT no fígado acompanhada por um recrutamento de células NK para este órgão. O desaparecimento de células NKT parece estar relacionado a uma regulação negativa do TCR ou de NK1.1 após a ativação. De qualquer forma a

possibilidade de recrutamento para outros órgãos não foi investigada (Kakimi *et al.*, 2000). Os mesmo autores demonstraram que o *clearance* viral mediado por células NKT durante a infecção por HBV não era dependente do recrutamento de células inflamatórias (Kakimi *et al.*, 2001). Importante frisar que o papel de células iNKT na resposta imune contra o HBV não é conhecido. Um estudo recente demonstrou que o tratamento de pacientes com HBV crônica utilizando  $\alpha$ Gal-Cer não resultou no *clearance* viral, o que pode sugerir que células NKT não estão envolvidas na resposta imune ao HBV em humanos (Woltman *et al.*, 2009).

Um importante papel tem sido sugerido para as células iNKT na infecção pelo vírus da hepatite C (HCV, também flavivirus) (Inoue *et al.*, 2006). Pacientes que sofrem de hepatite crônica induzida por HCV possuem números elevados de células NKT no fígado, incluindo uma grande regulação positiva de CD1d em células hepáticas (Yamagiwa *et al.*, 2008). Yamagiwa e colaboradores (2008) mostraram também um aumento significativo da proporção e número absoluto de células NK e NKT no fígado de pacientes infectados por HCV e que estavam recebendo terapia antiviral, incluindo IFN- $\alpha$ . Outros estudos têm demonstrado uma alta frequência de células NKT hepáticas CD1d-reativas, que apresentam perfil Th1, mas são do tipo não invariante ou vNKT (Exley *et al.*, 2002). Estas células são abundantes no fígado e baço em humanos, sugerindo uma nova linhagem celular, especialmente no fígado. Além do mais, o IFN- $\gamma$  produzido por estas células está associado com dano tecidual em resposta a infecção por HCV, reforçando a idéia de uma melhor caracterização destes tipos celulares em órgãos alvo durante a infecção. O papel protetor ou deletério de células vNKT ou iNKT nas infecções por HBV ou HCV é questionável, especialmente devido às diferenças entre as populações de células NKT no fígado em humanos e camundongos, o que impede maiores extrapolações no que diz respeito as suas funções.

Dados recentes indicam que células iNKT e vNKT podem ter papéis opostos na resposta imune, pelo menos no contexto de resposta contra tumores (Ambrosino *et al.*, 2007; Halder *et al.*, 2007; Arrenberg *et al.*, 2009). A estimulação seletiva de células vNKT é capaz de suprimir a atividade de “vigilância” antitumoral das células iNKT, e a estimulação de células iNKT leva a proteção contra o crescimento de tumores mesmo quando a resposta era dirigida em direção a um fenótipo Th2. Quando os dois tipos celulares são ativados simultaneamente, as células vNKT

parecem suprimir a ativação e o efeito protetor de células iNKT *in vivo* (Ambrosino *et al.*, 2007).

De forma semelhante, seria interessante examinar o papel destes dois subtipos celulares e suas interações na resposta imune antiviral. Um papel protetor para células iNKT tem sido sugerido na infecção experimental pelo HSV-1 (cepa SC16). Camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  e o  $CD1d^{-/-}$  mostraram maior susceptibilidade a infecção do que camundongos C57BL/6 selvagens. Os animais deficientes apresentaram *clearance* viral inadequado na pele e em gânglios da raiz dorsal, sugerindo um importante papel para células iNKT neste modelo de infecção (Grubor-Bauk *et al.*, 2003). De forma similar, em um modelo experimental de infecção vaginal pelo HSV-2, células iNKT são necessárias para a resolução e controle da infecção (Ashkar e Rosenthal, 2003). Mas ao contrario dos achados de Grubor-Bauk e colaboradores (2003), outro estudo com camundongos  $CD1d^{-/-}$  sugerem que células iNKT não são necessárias para a resolução e controle da severidade da doença Após infecção pelo HSV-1 (cepa KOS). Estas discrepâncias parecem estar diretamente relacionadas com a virulência das cepas em questão: KOS é menos virulenta que SC16 (Cornish *et al.*, 2006).

Alguns poucos estudos também investigaram o papel de células  $CD1d$ -reativas na infecção experimental com o vírus da encefalomiocardite (EMCV), um picornavirus que pode causar diabetes aguda, paralisia e miocardite ainda nos primeiros dias de infecção (Exley *et al.*, 2003; Ilyinskii *et al.*, 2006). Camundongos  $CD1d^{-/-}$  são bastante susceptíveis a infecção quando comparados a camundongos selvagens, e esta resistência a infecção parece ser mediada por IL-12 e IFN- $\gamma$  (Exley *et al.*, 2003). A depleção de células NK e NKT em camundongos selvagens utilizando anticorpos anti-asialo GM1 também levaram a um aumento considerável da susceptibilidade a infecção pelo EMCV-D, e a resposta a infecção em animais  $CD1d^{-/-}$  prevalece, mostrando que a resposta é essencialmente mediada por iNKT, e não NK. Como camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  não foram utilizados no estudo, é possível que células T  $CD1d$ -reativas estejam participando também da resposta. A eficácia do anticorpo anti-asialo GM1 em depletar somente NKT é um ponto crítico, uma vez que anticorpos contra NK1.1 podem depletar tanto NKT como iNKT (Seki *et al.*, 1997).

Similar a infecção por HCV, o papel das células iNKT em um modelo experimental murino de infecção pelo RSV (vírus respiratório sincicial) é bastante



controverso, uma vez que o desenvolvimento da doença depende do *background* genético do camundongo (Johnson *et al.*, 2002). Linhagens resistentes ao RSV, como BALB/c, respondem ao tratamento com  $\alpha$ Gal-Cer basicamente com o aumento do *clearance* viral e com perfil de produção de citocinas tanto Th1 como Th2. De forma relevante, existe uma expansão efetiva de células T CD8+ na infecção por RSV, dependente de células NKT, realçando a importância deste subtipo no controle da infecção. Resultados similares foram observados na infecção experimental por *Plasmodium berghei* (Hansen *et al.*, 2003). Estes dados reforçam a ideia de que tanto o patógeno como o *background* genético do hospedeiro são aspectos essenciais para se determinar a função e dinâmica de células iNKT em doenças infecciosas.

Em infecções pelo HIV-1 tem sido demonstrado que subtipos celulares iNKT/CD4+ são alvos do HIV-1 devido ao seu tropismo por células que co-expressam CD4 com CCR5 e/ou CXCR4 (Motsinger *et al.*, 2002; Li e Xu, 2008). Células iNKT/CD4+ presentes em PBMCs humanos expressam altos níveis de CCR5 em comparação a células T CD4+ convencionais, sendo altamente responsivas a infecção após tratamento com  $\alpha$ Gal-Cer (Motsinger *et al.*, 2002). No geral, o HIV causa uma rápida queda no número total de células iNKT na circulação a uma taxa mais rápida do que aquela observada para células T CD4+. Importante frisar que estudos são necessários para se estabelecer a cinética de ativação/frequência de células iNKT durante os estágios crônicos e agudos da infecção pelo HIV.

Em termos gerais, os dados discutidos aqui reforçam a evidência de que células iNKT parecem participar de forma importante em diversas infecções virais. Mesmo que em muitos casos o *background* genético e a virulência do patógeno, associado a discrepâncias de resposta do hospedeiro em estágios agudos e crônicos da doença contribuam para as lacunas existentes a respeito do fenótipo a ser interpretado. O estudo destes subtipos celulares pode trazer novas informações no âmbito das interações celulares e moleculares entre patógeno e hospedeiro.

Não existem estudos acerca do papel de células iNKT e vNKT em modelos experimentais de infecção pelo vírus da dengue, assim como em amostras de pacientes cometidos pela FD ou FHD, o que torna o presente estudo de importância para a ampliação do conhecimento acerca de tipos celulares fundamentais

envolvidos na infecção pelo *Dengue vírus* e sua contribuição para o desenvolvimento da doença.

#### **1.4.8. Quimiocinas e o tráfego de células iNKT**

O recrutamento de leucócitos para os tecidos é dependente de uma série de passos de adesão e ativação mediados por moléculas e pela interação quimiocinas-receptores, como revisto nos tópicos iniciais (Johnston e Butcher, 2002). A expressão de receptores para quimiocinas e de moléculas de adesão em células T é regulada durante o desenvolvimento, enquanto a expressão de quimiocinas é geralmente controlada por citocinas e outros sinais que restringem sua distribuição no microambiente tecidual. Isso resulta em padrões de migração distintos para vários subtipos de leucócitos (Kunkel e Butcher, 2002).

Todas as células T naïve expressam uniformemente L-selectina e CCR7, que medeiam o acesso a tecidos linfóides através de vênulas de endotélio alto (HEV) e possuem e possuem um importante papel na localização de células T no paracortex dos linfonodos. Em contraste, células T de memória e efetoras são heterogêneas no que diz respeito à expressão de receptores de quimiocinas e moléculas de adesão, além de exibirem comportamento diverso no que diz respeito ao seu recrutamento. Subtipos distintos de células T foram caracterizados por terem como alvo a pele (expressando antígeno cutâneo para linfócitos, ou CLA+, e CCR4+), intestino ( $\alpha 4\beta 7$  hi e CCR9+) e regiões de mucosa (CCR10+), assim como vários sítios inflamatórios (i.e. CCR1+, CCR2+, CCR5+ e CXCR3+) (Kim *et al.*, 2001; Johnston e Butcher, 2002; Kunkel e Butcher, 2002).

Células  $V\alpha 24$  iNKT se assemelham a células T efetoras neste caso, uma vez que subtipos CD4+, CD8+ ou duplo-negativas (DN) expressam de forma homogênea receptores de quimiocinas não relacionados ao recrutamento para o tecido linfóide, como CCR2, CCR5 e CXCR3 (Gumperz *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Motsinger *et al.*, 2002). Em contraste, somente 20% das células iNKT expressam CCR7, e quase nenhuma célula iNKT do sangue expressa CXCR5 (Gumperz *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002), sendo estes receptores necessários para o recrutamento para as regiões T e B de órgãos linfóides. Isto é consistente com a relativa escassez de células iNKT em órgãos linfóides

secundários. Vários receptores para quimiocinas, como CCR1, CCR4, CCR6 e CXCR6 são diferencialmente expressos por CD4<sup>+</sup> e subtipos CD4-NKT.

Um número bem significativo de células CD4<sup>+</sup>NKT expressa CCR4 (Kim *et al.*, 2002), enquanto CCR1, CCR6 e CXCR6 são preferencialmente expressos por duplo-negativas e células CD8<sup>+</sup>NKT (Gumperz *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Importante frisar que células NKT não-restritas a CD1d (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) compartilham padrões de expressão de receptores de quimiocinas com células V $\alpha$ 24 iNKT (Campbell *et al.*, 2001), sugerindo que estas células com TCRs diversificados podem migrar para regiões similares. Entretanto, CCR4 somente foi detectado em níveis significativos em células CD4<sup>+</sup> V $\alpha$ 24 iNKT, sugerindo que estas células podem ainda migrar para outras regiões adicionais. Atualmente existem poucos dados sobre o papel de quimiocinas no recrutamento de células NKT para diferentes tecidos *in vivo*, sendo que os estudos raramente estão focados entre a relação receptores de quimiocina *versus* acúmulo de células NKT. A discussão se atém muito mais à produção e interação de citocinas e moléculas pró-inflamatórias produzidas por estes subtipos celulares com as células residentes no microambiente em questão.

Células NKT são capazes de migrar em resposta a CXCL2/MIP-2, ligante natural de CXCR2, além de que CXCR2 é necessário para o acúmulo de células NKT CD1d-restritas no baço durante a indução de tolerância em resposta a antígeno pela via ocular. Entretanto, a migração de células V $\alpha$ 14 iNKT murinas (ou células não restritas a CD1d) induzida por MIP-2 não é observada, o que sugere que a necessidade de CXCR2 para este recrutamento é um perfil de outro tipo celular (Faunce *et al.*, 2001). No mesmo modelo, os autores mostraram que a produção de CCL5/RANTES por células NKT murinas é importante para o recrutamento de APCs e a para a indução de células T regulatórias (Tregs) (Faunce e Stein-Streilein, 2002), sugerindo que células NKT podem participar da resposta imune através da geração de quimiocinas em adição a citocinas.

Em outro estudo, CCL2/MCP-1 esta implicada no recrutamento de células V $\alpha$ 14 iNKT para o pulmão, em camundongos, após infecção por criptococos (Kawakami *et al.*, 2001). Os autores, entretanto, não definem o quanto CCL2/MCP-1 é diretamente ativo em células NKT. Seria importante determinar as interações quimiocina:receptor que medeiam tanto o tráfego homeostático de subpopulações de células NKT como o seu recrutamento para sítios de inflamação. Também existe

uma heterogeneidade na expressão de moléculas de adesão em células V $\alpha$ 24 iNKT. Mais de 20% das células NKT humanas expressam CLA (Gumperz *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002), associado com a ligação a E-selectina e direcionamento linfocítico para a pele, enquanto uma maior proporção de células NKT expressa a integrina  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, que interage com outra molécula de adesão, a MAdCAM-1 (Gumperz *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002). Em adição a estes dados, LFA-1 possui um papel crucial no recrutamento de células NKT NK1.1+ (a maioria células V $\alpha$ 24 iNKT) para o fígado de camundongos mas não para outros tecidos (Emoto *et al.*, 1999). Entretanto, isto pode ser um efeito indireto relacionado ao recrutamento de células NK antes do recrutamento de células NKT para o órgão (Miyamoto *et al.*, 2000).

A diversidade de combinações que resultam na expressão diferencial tanto de receptores para quimiocinas como para moléculas de adesão contribuem de forma importante para direcionar células NKT para diferentes tecidos. Quimiocinas também produzidas em sítios específicos durante a resposta parecem tanto ativar como recrutar mais tipos celulares para o microambiente. A diferença entre os subtipos de células NKT parece também contribuir para esta diversidade imunoregulatória observada em diversos estudos *in vivo*.

## **II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

## **2.1. JUSTIFICATIVA**

Enquanto a última década testemunhou importantes avanços na biologia do DENV, incluindo as determinações estruturais da partícula viral e as proteínas-chave envolvidas, as análises dos mecanismos de tradução e replicação viral, além da caracterização funcional das proteínas virais, a patogênese do dengue permanece pouco elucidada, onde a complexa inter-relação entre os fatores virais e do hospedeiro ainda não são bem conhecidos. As observações clínicas da doença têm fornecido algumas informações a respeito da patogênese da infecção pelos DENV, principalmente no que diz respeito a mediadores inflamatórios como quimiocinas e citocinas, além de populações celulares envolvidas nesta resposta, como DCs e células T CD4+. Entretanto, a ausência de modelo animal adequado, imunocompetente, tem atrasado as pesquisas acerca da fisiopatologia da doença, principalmente os mecanismos celulares e moleculares que medeiam o seu agravamento e possíveis interações sistêmicas, mecanismos chave na lesão tecidual e no mau prognóstico da doença.

Com um modelo animal reprodutível e capaz de mimetizar a doença e seus sintomas assim como observados em humanos, tornou-se possível o estudo de moléculas chave na doença. A maioria já é relatada na clínica e possuem notável associação com eventos observados em quadros de FHD, como os elevados níveis de quimiocinas da família CC. Além do mais, populações celulares com importante função na resposta imune, e que participam de uma complexa rede de ativação celular e produção de mediadores inflamatórios, como as células NKT invariantes (iNKT), se tornam um importante alvo de estudo em infecções virais. Uma possível relação entre quimiocinas CC e células iNKT na infecção pela dengue pode trazer novas abordagens e estratégias para o estudo da fisiopatologia da infecção pelo vírus, além de abrir possibilidades para o estudo de alvos terapêuticos. A escassez de literatura envolvendo modelos experimentais de infecções por flavivírus e sua resposta inflamatória sistêmica, o que inclui choque e hemorragia, acaba também por validar o objeto de trabalho.

## **2. 2. Objetivos**

O presente trabalho de tese foi baseado em dois objetivos principais de estudo, consistindo em se investigar o papel dos receptores de quimiocinas CCR1, CCR2 e CCR4 na patogênese da dengue experimental em camundongos (**Objetivo 1**) além de se avaliar também o papel deletério das células NKT invariáveis (iNKT) na patogênese da infecção pelo vírus da dengue, utilizando-se o mesmo modelo experimental (**Objetivo 2**).

### **2.1.1. Objetivos específicos 1**

1. Investigar se os receptores para quimiocinas CC, respectivamente CCR1, CCR2 e CCR4, são importantes para a mortalidade e perda de peso associada à infecção pelo DENV-2 em camundongos WT ou geneticamente deficientes para estes receptores (KO).
2. Investigar se os receptores CCR1, CCR2 e CCR4 são importantes para o *clearance* viral no fígado e se também participariam das alterações hematológicas associadas à infecção pelo DENV-2 no presente modelo experimental, incluindo análise de plaquetas, hematócrito e granulócitos em camundongos WT ou geneticamente deficientes para estes receptores (KO) no dia 6 pós-infecção.
3. Investigar a participação dos receptores CCR1, CCR2 e CCR4 na lesão hepática associada à infecção experimental pelo DENV-2, avaliando-se por ELISA os níveis de citocinas (IL-6 e IFN- $\gamma$ ) e quimiocinas (CCL2/JE, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL5/RANTES) no fígado, além do acúmulo neutrofílico por MPO, análise histopatológica e dosagem de transaminases hepáticas no soro de camundongos WT ou geneticamente deficientes para estes receptores (KO) no dia 6 pós-infecção.
4. Investigar a participação dos receptores CCR1, CCR2 e CCR4 na resposta inflamatória sistêmica associada à infecção experimental pelo DENV-2,

avaliando-se por ELISA os níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ) e/ou quimiocinas (CCL2/JE, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES e CCL17/TARC) no soro e baço, além do acúmulo neutrofílico por MPO no baço de camundongos WT ou geneticamente deficientes para estes receptores (KO) no dia 6 pós-infecção.

5. Investigar por citometria de fluxo a frequência e perfil geral de ativação de células T CD4+, T CD8+ NKT (CD3+ DX5+), NK (CD3-, DX5+), neutrófilos (CD11b+ Ly6G+), e macrófagos (CD11b+ F4/80+) no baço de animais WT e deficientes para os receptores CCR1, CCR2 e CCR4 após a infecção pelo DENV-2, a fim de se avaliar a contribuição destes receptores para o tráfego e ativação de tipos celulares relevantes para a infecção no dia 6 pós-infecção.

### **2.1.2. Objetivos específicos 2**

1. Investigar por citometria de fluxo a participação, cinética de ativação (CD69) e produção de IFN- $\gamma$  por células iNKT após infecção pelo DENV-2 em animais WT entre os dias 3 e 5 pós-infecção.
2. Investigar se células iNKT participam da mortalidade e perda de peso associada a infecção pelo DENV-2 em camundongos WT, J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> e CD1d<sup>-/-</sup>. Investigar também se a transferência de células iNKT purificadas do fígado (CD5+ NK1.1+) de animais WT para animais J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> é capaz de reverter o fenótipo observado.
3. Investigar se células iNKT participam do *clearance* viral em órgãos alvo (baço e fígado) e também das alterações hematológicas e inflamatórias associadas a infecção pelo DENV-2 no presente modelo experimental, incluindo análise de plaquetas, hematócrito, monócitos e linfócitos, lesão hepática por análise histológica, além da produção de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p40) e/ou quimiocinas (CXCL1/KC), por ELISA, no



soro, baço e/ou fígado de animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  entre os dias 4 e 6 pós-infecção.

4. Investigar por citometria de fluxo o perfil geral de ativação de células NK (CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>), neutrófilos (CD11c<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>), células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> após a infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$ , utilizando-se marcadores de ativação e/ou produção de IFN- $\gamma$  afim de se avaliar a colaboração entre células iNKT e estas populações no presente modelo no dia 5 pós-infecção.
5. Investigar a ativação de células iNKT utilizando estratégias de pré-tratamento e pós-tratamento com o glicolípide  $\alpha$ GalCer em animais WT durante a infecção experimental pelo DENV-2, afim de se investigar o efeito da ativação desta população sobre a mortalidade, perda de peso e alterações hematológicas (plaquetas, hematócrito e granulócitos) e carga viral em órgãos alvo (baço e fígado) no dia 6 pós-infecção.

### **III. MATERIAL E METODOS**

### 3.1. Animais

Foram utilizados neste estudo camundongos selvagens (WT, *wild type*) C57BL/6 (H-2D<sup>b</sup>) machos ou fêmeas, com 8 a 10 semanas de idade, adquiridos da empresa Janvier (Le Genest-St-Isle, França). Camundongos CCR1<sup>-/-</sup>, CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup> machos ou fêmeas, de 8 a 10 semanas de idade, cruzados pelo menos 10 vezes em *background* C57BL/6, foram criados e mantidos até o momento dos experimentos no centro de criação do Instituto de Transgenose (CNRS, Orléans, França). O estudo com estes animais foi parte de um projeto colaborativo com o Dr. Bernhard Ryffel no Laboratoire d'Immunologie et d'Embryologie Moléculaires (IEM), UMR 6218 CNRS, Université d'Orléans, França, financiado pelo CNPq (Bolsa SWE PhD 04/2009-04/2010).

Animais J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> e CD1d<sup>-/-</sup>, machos ou fêmeas, de 8 a 10 semanas de idade, cruzados pelo menos 10 vezes em *background* C57BL/6, foram cedidos como parte de um projeto colaborativo com o Dr. François Trottein (Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, INSERM U1019, CNRS UMR8204, University Lille Nord de France, França) e mantidos no Instituto de Transgenose (CNRS, Orléans, França) até o momento dos experimentos. Todos os animais foram mantidos sob temperatura controlada (23°C) com um ciclo claro/escuro controlado de 12 horas, ração autoclavada *ad libitum*, sob condições isentas de patógenos, em caixas com ventilação individual (SPF, *specific pathogen-free conditions*).

### 3.2. Vírus

O vírus da dengue, sorotipo 2 (DENV-2), amostra P23085, foi obtido do State Collection of Viruses, Moscou, Rússia, e isolado de amostra clínica pelo Dr. George Ignatyev no SRC VB "Vector", Koltsovo, Rússia, em nível de biosegurança 3 (BSL-3). Para se aumentar a virulência da amostra no hospedeiro murino, o vírus foi injetado intracerebralmente em camundongos. De forma resumida, o vírus foi submetido a duas passagens no cérebro de camundongos neonatos. Os cérebros dos camundongos apresentando morbidade, no 5º dia após infecção, foram recolhidos e preparados em uma solução de homogenato de cérebro em meio MEM (*modified Eagles's médium*, Gibco) a 10% (p/v). Após este procedimento, 8 passagens seqüenciais foram realizadas em camundongos BALB/c de diferentes

idades (1-4 semanas), por via intraperitoneal (i.p.). Duas passagens seqüências foram feitas em cada grupo de cada idade. Após cada passagem, os cérebros de camundongos moribundos, no 5º dia após infecção, foram recolhidos e preparados em uma solução de homogenato de cérebro em meio MEM a 10% (p/v), estocados a -80°C, e então utilizados em infecções posteriores, além da padronização do modelo (Atrasheuskaya *et al.*, 2003). As últimas passagens do vírus adaptado DENV-2 P23085 foram feitas em células LLC-MK2 (rim de macaco Rhesus, ATCC) para produzirem estoques virais em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich), sendo então armazenados a -80°C.

Para se calcular o título viral em sobrenadante de células LLC-MK2, expresso como a DL<sub>50</sub> (dose letal média), grupos de 10 camundongos BALB/c, 4 semanas, foram inoculados com DENV-2, em diluições seriais, por via i.p. e a curva de letalidade foi calculada. O título do estoque de DENV-2 utilizado neste trabalho foi determinado por titulação convencional em placa (ver a seguir) e representa  $2 \times 10^6$  UFP/ml ou  $10^5$  DL<sub>50</sub>/ml de sobrenadante de LLC-MK2 assim como calculado em camundongos BALB/c, uma linhagem mais susceptível (Shresta, Kyle, Robert Beatty, *et al.*, 2004). A seqüência das porções dos genes das proteínas E e NS1 do vírus DENV-2 adaptado forem depositadas no *GenBank* sob o número de acesso AY927231 (Atrasheuskaya *et al.*, 2003) e apresentam 99% de identidade com seqüências completas de DENV-2 já depositadas (Figura 8).

### **3.3. Estratégia experimental**

Para os dois grandes grupos de experimentos descritos, componentes dos **Objetivos 1 e 2** desta tese, a estratégia experimental seguiu basicamente o mesmo padrão, diferenciado-se apenas por determinadas dosagens ou abordagens em órgãos ou sistemas específicos (Figura 9).

Durante o protocolo de infecção pelo vírus DENV-2, até o momento do sacrifício, os animais foram mantidos em nível de biosegurança 2 (BSL-2) no Instituto de Transgenose (CNRS, Orléans, França).

Para avaliação da letalidade e inflamação, os camundongos foram inoculados, por via intraperitoneal, com 100µl de uma solução contendo DENV-2 a 10 ou 30DL<sub>50</sub> diluídos em DPBS (Gibco) estéril (10DL<sub>50</sub> para os experimentos componentes do **Objetivo 1**, 30 DL<sub>50</sub> para os experimentos componentes do

**Objetivo 2**, inóculos escolhidos de acordo com o tipo de resposta desejada ainda no início de cada estudo. Importante frisar que não há diferença apreciável na letalidade entre os dois inóculo). Camundongos dos grupos controles não infectados receberam injeção de sobrenadante de células LLC-MK2, não infectadas, diluído em DPBS estéril da mesma forma que o vírus. Uma  $DL_{50}$  corresponde ao inóculo necessário para matar 50% de camundongos BALB/c com 4 semanas, e corresponde a aproximadamente 20 UFP, como calculado por titulação em células LLC-MK2 e citado anteriormente. A taxa de letalidade e perda de peso foram avaliadas a cada 12h até o dia 14 pós-infecção (p.i.). Em todos os experimentos, os camundongos que sobreviviam até o dia 14 não possuíam mais sinais de doença, como piloereção, perda de peso ou prostração.

Os outros parâmetros foram avaliados geralmente nos dias 4 ou 6 p.i. (experimentos para avaliar a resposta inflamatória) ou 3, 5 ou 6 p.i. (experimentos para análise de populações celulares por citometria de fluxo), pontos de sacrifício definidos pelo momento onde a doença começa a apresentar sinais clínicos ou onde a maioria dos animais ainda estava viva e apresentavam sinais clínicos da doença grave. Em todos os experimentos utilizando-se camundongos geneticamente modificados (KO), experimentos com os controles não infectados foram realizados.

Nos dias definidos para o sacrifício p.i., os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de Quetamina (100 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg) diluídas em DPBS estéril. O sangue foi recolhido após incisão no plexo braquial e separado para preparação de soro ou para análise hematológica. Logo após, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e amostras homogêneas de baço e fígado foram recolhidas para avaliação de citocinas, atividade de MPO, citometria de fluxo (FACS) e/ou carga viral. Todas as amostras foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  após o sacrifício. Preparações de fígado para análise histológica também foram realizadas. Para todos os experimentos foram utilizados um n experimental de 4 a 7 animais (experimentos para investigar resposta inflamatória) ou de 10 a 12 animais (letalidade e perda de peso)

A

▼ Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY927231.1	Dengue virus type 2 mouse-adapted strain polyprotein gene, partial cds	734	734	100%	0.0	100%	
AY592245.1	Dengue virus type 2 isolate 23085/1960/vellore polyprotein (E NS1) gene, par	702	702	99%	0.0	98%	
FJ538919.1	Dengue virus 2 strain NIV_715541 polyprotein gene, partial cds	675	675	99%	0.0	97%	
HMS82117.1	Dengue virus 2 strain D2/TO/UH04/1974, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82116.1	Dengue virus 2 strain D2/TO/UH94/1974, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82115.1	Dengue virus 2 strain D2/TO/UH44/1974, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82114.1	Dengue virus 2 strain D2/TO/UH39/1974, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82113.1	Dengue virus 2 strain D2/TO/UH20/1974, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82112.1	Dengue virus 2 strain D2/TO/UH19/1974, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82109.1	Dengue virus 2 strain D2/PF/UH57/1971, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82108.1	Dengue virus 2 strain D2/PF/UH50/1972, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82107.1	Dengue virus 2 strain D2/AS/UH73/1972, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82106.1	Dengue virus 2 strain D2/AS/UH85/1972, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82105.1	Dengue virus 2 strain D2/AS/UH79/1972, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82104.1	Dengue virus 2 strain D2/AS/UH77/1972, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82102.1	Dengue virus 2 strain D2/NC/UH37/1971, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82101.1	Dengue virus 2 strain D2/FJ/UH22/1971, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82100.1	Dengue virus 2 strain D2/FJ/UH40/1971, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
HMS82099.1	Dengue virus 2 strain D2/FJ/UH21/1971, complete genome	664	664	99%	0.0	96%	
GQ398257.1	Dengue virus 2 strain DENV-2/ID/1183DN/1977, complete genome	658	658	99%	0.0	96%	
HMS82111.1	Dengue virus 2 strain D2/TO/UH16/1974, complete genome	658	658	99%	0.0	96%	
FJ538921.1	Dengue virus 2 strain NIV_803347 polyprotein gene, partial cds	658	658	99%	0.0	96%	
FJ538918.1	Dengue virus 2 strain NIV_715433 polyprotein gene, partial cds	658	658	99%	0.0	96%	
FJ538917.1	Dengue virus 2 strain NIV_715420 polyprotein gene, partial cds	658	658	99%	0.0	96%	
FJ538916.1	Dengue virus 2 strain NIV_715396 polyprotein gene, partial cds	658	658	99%	0.0	96%	
FJ538915.1	Dengue virus 2 strain NIV_673332 polyprotein gene, partial cds	658	658	99%	0.0	96%	
FJ538910.1	Dengue virus 2 strain NIV_64553 polyprotein gene, partial cds	658	658	99%	0.0	96%	
GQ868600.1	Dengue virus 2 isolate DENV-2/PR/BID-V3367/1969, complete genome	658	658	99%	0.0	96%	
DQ448238.1	Dengue virus type 2 isolate P23085 INDI-60 polyprotein gene, partial cds	658	658	99%	0.0	96%	
AY744147.1	Dengue virus type 2, complete genome	658	658	99%	0.0	96%	

B

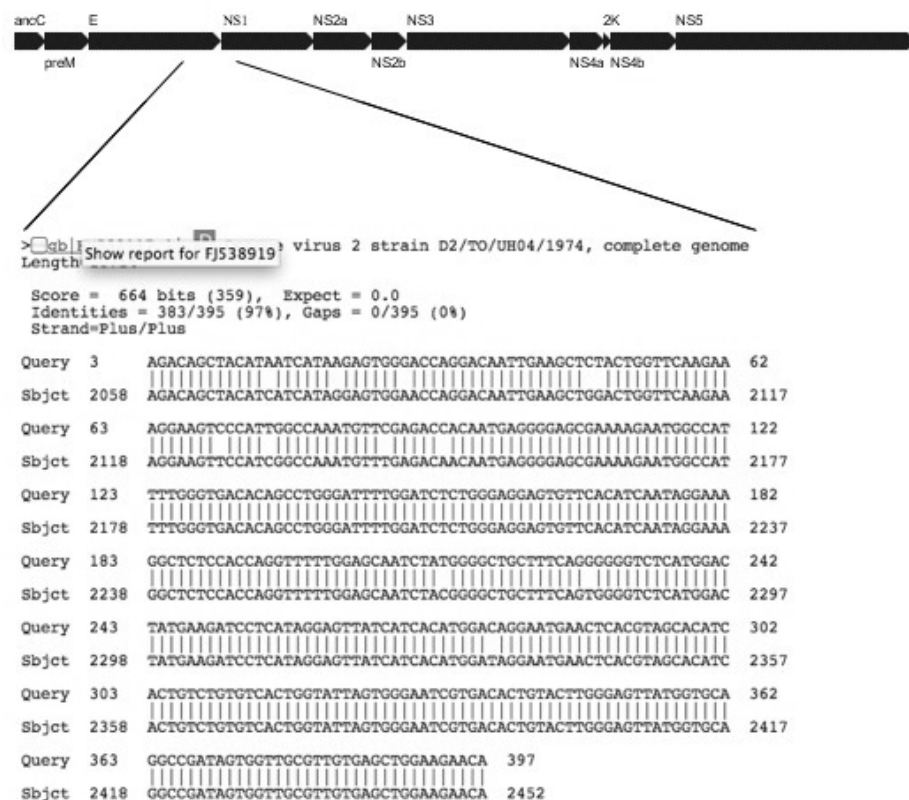
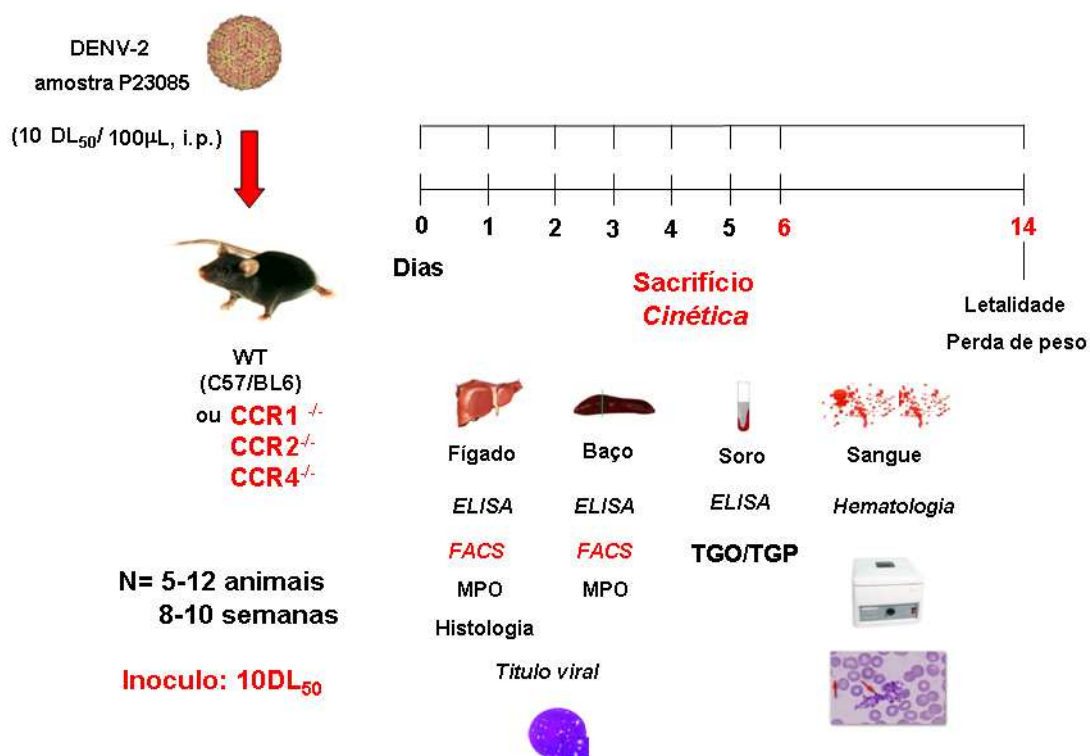


Figura 8. Alinhamento da seqüência do DENV-2 adaptado em camundongos. Em A, alinhamento da seqüência parcial do dengue vírus sorotipo-2 adaptado em camundongos (AY927231) com seqüências completas e parciais de DENV-2 utilizando-se o BLAST. Em B, alinhamento da seqüência AY927231 com a seqüência completa do DENV-2 com maior identidade (HM582117), mostrando que AY927231 corresponde as regiões do genoma de DENV-2 referentes às proteínas E e NS1 (traços em preto).

## Objetivo 1



## Objetivo 2

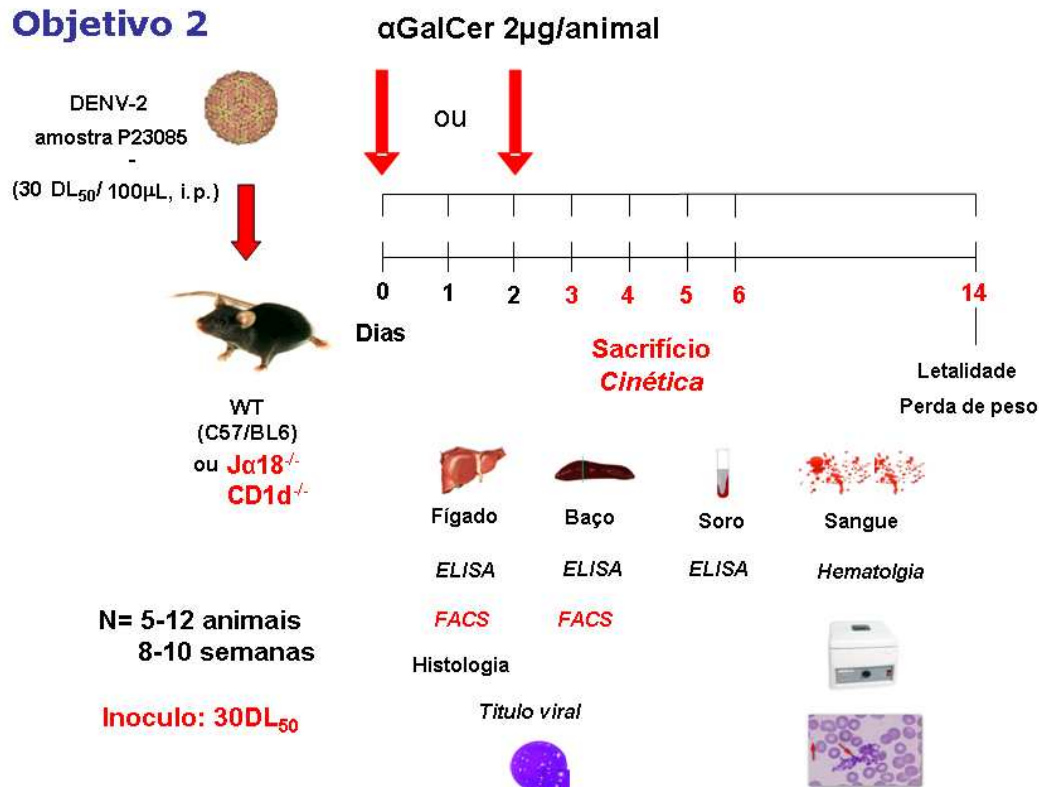


Figura 9. Design experimental esquemático proposto para os Objetivos 1 e 2.

### **3.4. Comitê de Ética**

Todos os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho estão de acordo com as regulamentações vigentes sobre ética e experimentação animal do governo francês assim como foram aprovados *pelo Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale*, CNRS, Orléans, França (documento CLE CCO 2009-013).

### **3.5. Avaliação de parâmetros hematológicos**

O sangue foi obtido através do plexo braquial de animais anestesiados utilizando-se seringas e pipetas heparinizadas nos dias de sacrifício p.i. anteriormente indicados. Após coleta, o sangue foi estocado em tubos heparinizados (50 U/ml de heparina) e deixado sob leve agitação durante todo processo de aquisição dos dados. Número de plaquetas e porcentagens de hematócrito e granulócitos foram obtidas através de contagem no aparelho Coulter Counter (S-Plus Jr, Beckman Coulter), utilizando-se 60µl de sangue para duas leituras por amostra. Os resultados estão expressos como porcentagem de hematócrito ou granulócito, além do número de plaquetas por µl de sangue.

### **3.6. Titulação do vírus da Dengue**

Células LLC-MK2 foram crescidas em meio DMEM completo com 5% de SFB (soro fetal bovino, Cultilab) e antibióticos (penicilina 100 U/ml e gentamicina 50 µg/ml), sendo cultivadas em placa de seis poços (Techno Plastic Products AG) a uma densidade média de  $1,5 \times 10^6$  células/poço. Tecidos de animais infectados foram macerados utilizando-se cadinho e pistilo, em ambiente estéril, a fim de se preparar uma solução 10% (p/v) em DMEM incompleto (sem SFB) com antibióticos que foi então diluída serialmente. Alíquotas de 500 µl desta série de diluições foram inoculadas em células com monocamadas recém fechadas, utilizando-se como controle um poço com células não infectadas, um com sobrenadante de células LLC-MK2 não infectadas e outro com alíquota do vírus DENV-2 utilizado. Após uma hora de incubação sob agitação a cada 20 minutos, o meio foi desprezado, e as células lavadas com uma solução de tampão fosfato estéril (PBS, pH 7.4). Em seguida, foi adicionado meio 199 (*Earle's salts*, Gibco) com L-glutamina, antibióticos, 3% de SFB



e 1.5% de carboximetilcelulose, sendo as placas incubadas a 37°C por 9 dias. As placas foram coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta para a determinação do título das amostras, os quais foram expressos em UFP/mL (unidades formadoras de placas por mililitro de material utilizado). Os dados da titulação viral são aqui expressos como UFP/100 mg de tecido.

### **3.7. Dosagem de transaminases hepáticas TGO e TGP**

A transaminase glutâmico oxalacética (TGO), também chamada de aspartato aminotransferase (AST), e transaminase glutâmico pirúvica (TGP), também conhecida como alanina aminotransferase (ALT), ou alanina transaminase, são indicadores sensíveis de dano hepático em diferentes tipos de doenças, incluindo as formas severas da infecção pelo *Dengue vírus*. As enzimas foram dosadas em amostras de soro não-hemolisado nos dias 4 e 6 p.i. O ensaio colorimétrico utilizado foi feito seguindo as recomendações do fabricante, utilizando-se kit diagnóstico já estabelecido (Quibasa, Bioclin, Brasil).

### **3.8. Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas**

Amostras de baço ou fígado, previamente estocadas a -80°C, foram homogeneizadas em DPBS estéril contendo um coquetel de inibidores de proteases Roche® (F. Hoffmann-La Roche Ltd) utilizando-se um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Amostras de soro ou sobrenadante do homogeneizado tecidual foram utilizados para as dosagens, após diluição em albumina do soro bovino (BSA, Sigma) a 0,1%. Os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40/IL-23, CXCL1/KC, CCL2/JE, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL17/TARC foram medidos diferencialmente no soro, baço ou fígado utilizando-se kits de anticorpos adquiridos do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo recomendado. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (96 MicroWell™ Plates, NUNC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA ). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7.4 e incubados *overnight* a 4° C. A reação foi bloqueada com uma solução de BSA a 1% em PBS. A reação foi detectada por incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (*HRP-Streptavidin Pharmingem* diluída a 1:4000) e revelada com OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*, Sigma). Após 30 minutos a reação foi parada com

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M. A leitura foi feita em leitor de ELISA com filtro para um comprimento de onda de 492 nm. Os ensaios têm uma sensibilidade de 8-16 pg/ml de acordo com o fabricante.

### **3.9. Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO) tecidual**

Para a análise da atividade da MPO, como um parâmetro indireto para avaliar o acúmulo de neutrófilos no tecido após a infecção (Souza *et al.*, 2003), amostras de baço e fígado de animais infectados e não infectados, foram homogeneizadas (Dispomix, Medic Tools) em DPBS estéril na proporção de 10% (p/v) contendo 0,5% de Hexadecil-Trimetil Brometo de Amônia (HTAB) e 5 mM de EDTA. As amostras foram então incubadas a 60°C por 1 hora para inativação da catalase endógena e centrifugadas a 10.000 g por 10 mins., a 4°C. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante obtido foi colocada em microtubos com 600 µL de HBSS (*Hank's Balanced Salt Sodium*, Gibco), 100 µl de dihidrocloreto de o-dianisidina (1.25 mg/ml) e 100 µl de uma solução a 0.1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). Após cerca de 15 mins. de incubação a 37°C sob agitação, a reação foi parada com 100 µl de uma solução de NaN<sub>3</sub> a 1% e 200 µl da solução final foram transferidos para placas de 96 poços (NUNC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A atividade da MPO foi determinada por absorbância a 460 nm, com o branco como correção. Os resultados são expressos como unidades arbitrárias (O.D. 460 nm).

### **3.10. Preparação dos cortes para análise histológica**

No dia 6 p.i, os animais foram sacrificados e amostras homogêneas de fígado, órgão de escolha pelo tipo de lesão peculiar e representativa da manifestação grave da infecção, foram coletadas e guardadas em tubos de 15 ml (Falcon) contendo uma solução de formaldeído a 10% em PBS (pH 7.4) por no máximo 2 dias e depois transferidas para tubos contendo uma solução de etanol a 70%, até o processamento e inclusão. O processamento para histologia e inclusão em parafina foi feito no IEM, Orléans, França seguindo protocolo padrão estabelecido no laboratório. A preparação das lâminas, incluindo corte em micrótomo, fixação em lâminas histológicas e coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) foram gentilmente realizados no *Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine*, University of Cape Town, África do Sul (Prof. Frank Brombacher). As fotos foram obtidas

utilizando-se o programa QCapture Pro 6.0 (QImaging, Canadá) e são representativas de 10-15 campos por lâmina, no aumento de 200X ou 400X.

### **3.11. Purificação de células iNKT e transferência adotiva**

Para os experimentos de células adotivas, células do fígado de camundongos selvagens doadores (C57BL/6) foram marcadas com anticorpos anti-NK1.1 (PE-conjugado) e anti-CD5 (APC-Conjugado), ambos adquiridos da BD Pharmingen. As células marcadas foram isoladas utilizando o separador de células BD FACSAria e o programa BD FACSDiva (BD Biosciences). Células iNKT representam aproximadamente 80-90% do total de células NKT presentes no fígado. Camundongos recipientes  $J\alpha 18^{-/-}$  receberam por via intravenosa (i.v.) 100 $\mu$ l de DPBS contendo  $1 \times 10^6$  células NKT purificadas ou somente DPBS (controle). Após aproximadamente 16 horas estes camundongos foram infectados com DENV-2, seguindo o mesmo protocolo já citado.

### **3.12. Tratamento com o ativador de células NKT $\alpha$ GalCer**

O glicolípide  $\alpha$ GalCer ( $\alpha$ Galactosil-Ceramida), ativador de células NKT, foi gentilmente cedidos pelo Prof. François Trottein para os experimentos presentes no Objetivo 2. Animais C57BL/6, WT, de 8 a 10 semanas foram tratados com 200 $\mu$ l, por via intraperitoneal, de uma solução de DPBS estéril contendo  $\alpha$ GalCer levando a uma dose final de 2 $\mu$ g/animal. Animais controle foram tratados com DPBS. Foi realizado um tratamento único 1 hora antes da infecção (pré-tratamento) ou 2 dias depois da infecção (pós-tratamento). Letalidade, e perda de peso foram analisadas até o dia 14 para os animais sobreviventes. Um experimento com o pós-tratamento foi realizado, com sacrifício no dia 6, a fim de se investigar parâmetros hematológicos.

### **3.13. Análise de populações celulares por citometria de fluxo (FACS)**

#### **3.13.1. Obtenção de leucócitos do baço e fígado**

Amostras de baço foram coletadas nos dias 3, 5 ou 6 p.i. para se investigar o perfil das populações leucocitárias nos tecidos durante a infecção pelo DENV-2. Os

pontos para avaliação foram escolhidos considerando-se o início da doença e recrutamento celular (dia 3 p.i., **Objetivo 2**), ou momentos anteriores ao dia onde a maioria dos animais sucumbem a doença, para se evitar células em apoptose/necrose ou em estado de ativação exacerbado (dia 5 p.i. para **Objetivo 2**, ou dia 6 p.i. para o **Objetivo 1**). Importante frisar que as diferenças para os dias 5 ou 6 reside principalmente no inóculo, no caso 3 vezes maior para os experimentos realizados no dia 5, referentes aos resultados obtidos no **Objetivo 2**. Amostras de fígado foram utilizadas nos dias 3 e 5 p.i. para os experimentos *ex vivo* de ativação celular demonstrados no **Objetivo 2**.

Para a obtenção de leucócitos viáveis, amostras homogêneas de baço foram maceradas em peneiras estéreis (*cell strainers* de 100 µm, BD Biosciences, USA) e resuspendidas em DPBS suplementado com 2% de SFB. Após centrifugação, hemácias foram lisadas com tampão de lise (Sigma-Aldrich). Para os experimentos onde as marcações foram feitas em número definido de células, as mesmas foram contadas em azul de trypan e plaqueadas considerando-se o número de células viáveis.

Antes da extração dos leucócitos do tecido, o fígado dos animais foi perfundido com DPBS estéril para a remoção de células circulantes. Amostras homogêneas de fígado foram removidas e passaram por 20 mins. de digestão em meio RPMI contendo 1 mg/ml colagenase tipo VIII (Sigma-Aldrich) e 1 µg/ml de DNase tipo I (Sigma-Aldrich), a 37°C sob agitação. Após centrifugação a 2.300 RPM, 10 mins. a 4°C, as células foram lavadas e resuspendidas em gradiente de Percoll™ 36%, cuidadosamente depositado sobre outro gradiente de Percoll™ 72%. A preparação foi centrifugada por 30 mins. a 2.300 rpm a 22°C. As populações coletadas na interface foram lavadas em DPBS suplementado com 2% de SFB e posteriormente contadas em azul de trypan.

### **3.13.2. Marcação com anticorpos específicos**

Leucócitos murinos hepáticos e esplênicos foram marcados para identificação de subtipos celulares e perfil de ativação utilizando-se anticorpos monoclonais para determinadas moléculas de interesse. **Objetivo 1:** CD3 (PerCP-Cy5-conjugado), DX5 (FITC- conjugado), CD4 (Pacific Blue- conjugado), CD8 (APC-Cy7- conjugado), F4/80 (PE- conjugado) CD69 (PE- conjugado), CD11b (PerCp-Cy5.5- conjugado),

Ly6G (PE-Cy7- conjugado), CD86 (APC- conjugado) e controles de isotipo. **Objetivo 2:** TCR $\beta$  (FITC-conjugado), NK1.1 (PE- ou PerCp-Cy5.5- conjugado), CD5 (FITC- or APC- conjugado), CD4 (FITC- conjugado), CD8 (APC- conjugado), CD69 (PE-, PerCp-Cy5.5- ou APC- conjugado), IFN- $\gamma$  (Alexa Fluor<sup>®</sup> 647- conjugado), IL-4 (APC-conjugado), CD11c (PE-Cy7- conjugado), CD11b (PerCp-Cy5.5- conjugado), Ly6G (Alexa Fluor<sup>®</sup> 647- conjugado), CD62-L (PE- conjugado), granzima B (FITC-conjugado), CD107 $\alpha$  (PE- conjugado) e controles de isotipo. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Pharmigen (Le Pont de Claix, France). O anticorpo PE-tetrâmero CD1d carregado com PBS-57, foi adquirido do NIAID *Tetramer Facility* (Emory University, Atlanta, GA).

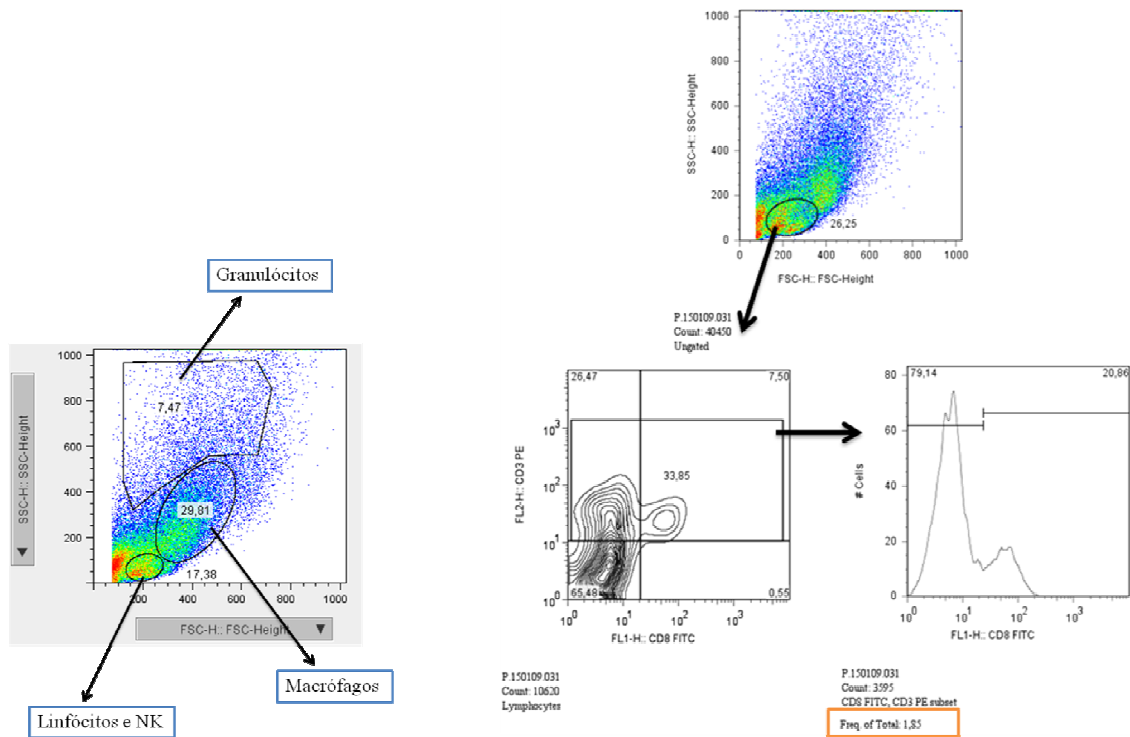
A fim de se analisar células iNKT, suspensões de leucócitos obtidas como citado anteriormente foram incubadas com diluições do tetrâmero CD1d por 30 mins em DPBS contendo 2% de SFB e 0,01% de NaN<sub>3</sub>. As células foram então lavadas e marcadas com outros marcadores de superfície. Para marcação intracelular, as células foram incubas por 20 mins a 4°C com tampão de fixação (BD Biosciences), lavadas, e então incubadas com tampão de permeabilização (Cytotfix/Cytoperm, BD Biosciences). Após lavagem, a células foram incubadas com IFN- $\gamma$  (Alexa Fluor<sup>®</sup> 647- conjugado), IL-4 (APC- conjugado) ou granzima B (FITC- conjugado). Em todos os casos, entre 5x10<sup>5</sup> a 1x10<sup>6</sup> eventos totais foram adquiridos para análise posterior através do citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences).

As populações analisadas foram selecionadas através da delimitação de *gates* em que as células em estudo situam-se de acordo com o seu tamanho e granulosidade (Figura 10). As análises de uma determinada população definida nos *gates* foram feitas levando em consideração o marcador constitutivo daquela população, por exemplo, CD3 para linfócitos ou, em, em outros casos, pelo controle de isotipo. Após a determinação dos quadrantes de marcações -/-, +/-, -/+, e +/+, os dois quadrantes positivos para o marcador constitutivo eram selecionados para a análise do segundo marcador, por determinação de picos de histograma. Com base nesses picos, definiam-se as duas subpopulações positivas para o primeiro marcador, sendo uma negativa para o segundo marcador e a outra positiva para o segundo marcador. No caso onde foram avaliados também os marcadores constitutivos individualmente, foi utilizado o valor referente à porcentagem da população nos dois quadrantes positivos para aquele marcador, em relação aos eventos adquiridos. Os valores utilizados para a determinação dessas duas

subpopulações utilizados foram as porcentagens daquelas subpopulações em relação aos eventos totais adquiridos ou os dados foram expressos em número absoluto de células, ajustando-se a porcentagem da subpopulação com a contagem de células após a extração destas dos tecidos. As análises finais foram realizadas utilizando-se o programa FlowJo 7.5.3 (TreeStar Inc.).

### **3.14. Análise Estatística**

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor foi de  $p < 0.05$ . Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad PRISM 4. A exclusão de valores que se portaram como outliers foi feita através do teste de Grubbs, com nível de significância igual a 0.05. As curvas de letalidade, construídas no mesmo software, foram comparadas utilizando o teste Log-rank qui-quadrado. Todos os dados apresentados são representativos de pelo menos 2 experimentos.



**Figura 10. Determinação das regiões (gates) referentes às populações leucocitárias analisadas nos órgãos alvo. À esquerda:** Exemplificação do método empregado para determinação das freqüências das subpopulações avaliadas. **À direita:** No primeiro quadro, é mostrada a delimitação do gate para linfócitos; em seguida, os quadrantes foram divididos com base na densidade da distribuição de células. Por último, foi selecionada uma área em que as células são, no caso, CD3+. Essa área é analisada em forma de histograma para o segundo marcador, no caso CD8 e a subpopulação positiva em relação ao esse marcador é expressa em freqüência do total de eventos adquiridos.

## **IV. RESULTADOS**

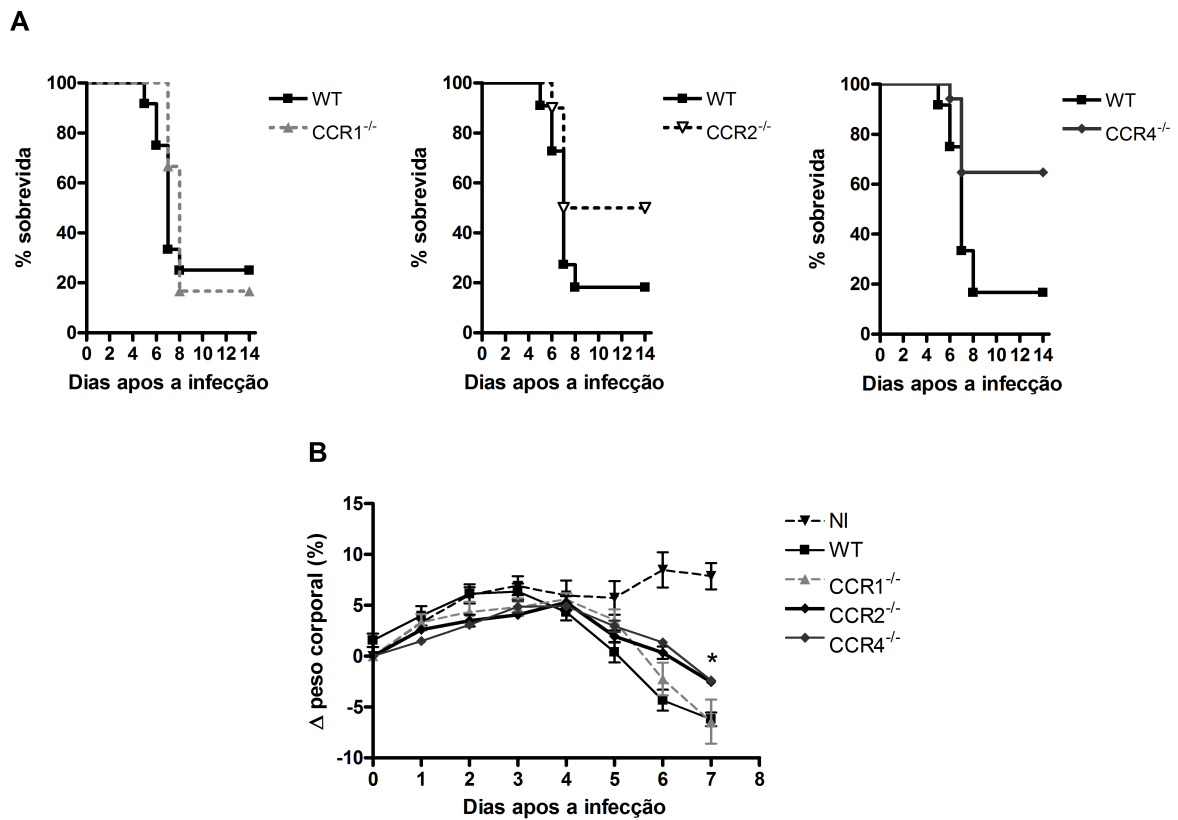


## Objetivo 1

### **PAPEL DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR1, CCR2 E CCR4 NA PATOGÊNESE DA DENGUE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

#### **4.1. Mortalidade e perda de peso em camundongos infectados pelo DENV-2**

Camundongos infectados com a amostra adaptada do DENV-2 apresentam manifestações clínicas que se assemelham a FHD/SCD em humanos, incluindo trombocitopenia e aumento de permeabilidade vascular, o que eventualmente pode levar ao choque e morte (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2009; Assuncao-Miranda *et al.*). Como visto na Figura 11A, animais WT infectados com um inóculo de 10 DL<sub>50</sub> apresentam mortalidade de aproximadamente 80% entre os dias 6 e 8 p.i. A taxa de mortalidade em camundongos CCR1<sup>-/-</sup> infectados foi bastante similar a observada em camundongos WT. Em contraste a mortalidade observada em camundongos CCR1<sup>-/-</sup>, camundongos CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup> apresentam maior sobrevivência e um perfil de proteção apreciável em relação a camundongos WT (P=0,0312 e P=0,0091, respectivamente). Nestes estudos de mortalidade após infecção pelo DENV-2 é possível observar uma rápida perda de peso, começando no dia 4 p.i. e levando a uma perda de cerca de 5% em torno do dia 7 p.i. para os animais sobreviventes. Esta perda de peso é freqüentemente associada com uma baixa mobilidade na caixa e prostração. Camundongos CCR1<sup>-/-</sup> perderam peso de uma forma similar a camundongos WT, sendo que esta perda foi significativamente reduzida em camundongos CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup>, que perderam cerca de 3% a menos quando comparados a camundongos WT (Figura 11B). O dia 6 p.i. foi escolhido para as demais análises subseqüentes.



**Figura 11. Mortalidade e perda de peso após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas.** Animais WT ou CCR1<sup>-/-</sup>, CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup> (KO) foram infectados por via intraperitoneal com 10 LD<sub>50</sub> da amostra adaptada de DENV-2 e monitorados para avaliação da mortalidade e perda de peso até o dia 14 p.i. **No painel A:** Porcentagem de sobrevivência (n=10-12 animais). **No painel B:** Variação do peso corporal associada à infecção pelo DENV-2 em animais WT e KO. Resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos. \* P < 0.05 quando comparado a animais WT infectados. **NI:** animais não infectados.

## 4.2. Parâmetros hematológicos e carga viral

A trombocitopenia, ou redução do número de plaquetas circulantes, é um fenômeno comumente observado em pacientes com a febre do dengue ou com FHD/SCD, mesmo que já se tenha sugerido que esta não parece relacionar-se com a severidade da doença ou com o seu resultado (Gubler, 1998; Guzman *et al.*, 2002). A trombocitopenia é primeiramente observada nos dia 3 após a infecção, apresentando seu pico entre os dias 6 e 7 após a infecção (Balmaseda *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2008; Binh *et al.*, 2009). No presente estudo, o número de plaquetas foi avaliado no dia 6 p.i., momento onde estes números eram mínimos e a porcentagem de animais vivos era máxima. O número de plaquetas em um animal WT infectado foi cerca de 30% do número observado em animais não infectados (Figura 12A). Ouve uma queda similar no número de plaquetas tanto em camundongos CCR1<sup>-/-</sup> como CCR2<sup>-/-</sup> infectados em comparação a seus controles. Entretanto, esta trombocitopenia esta significativamente reduzida em animais CCR4<sup>-/-</sup> infectados quando comparados a WT infectados (Figura 12A).

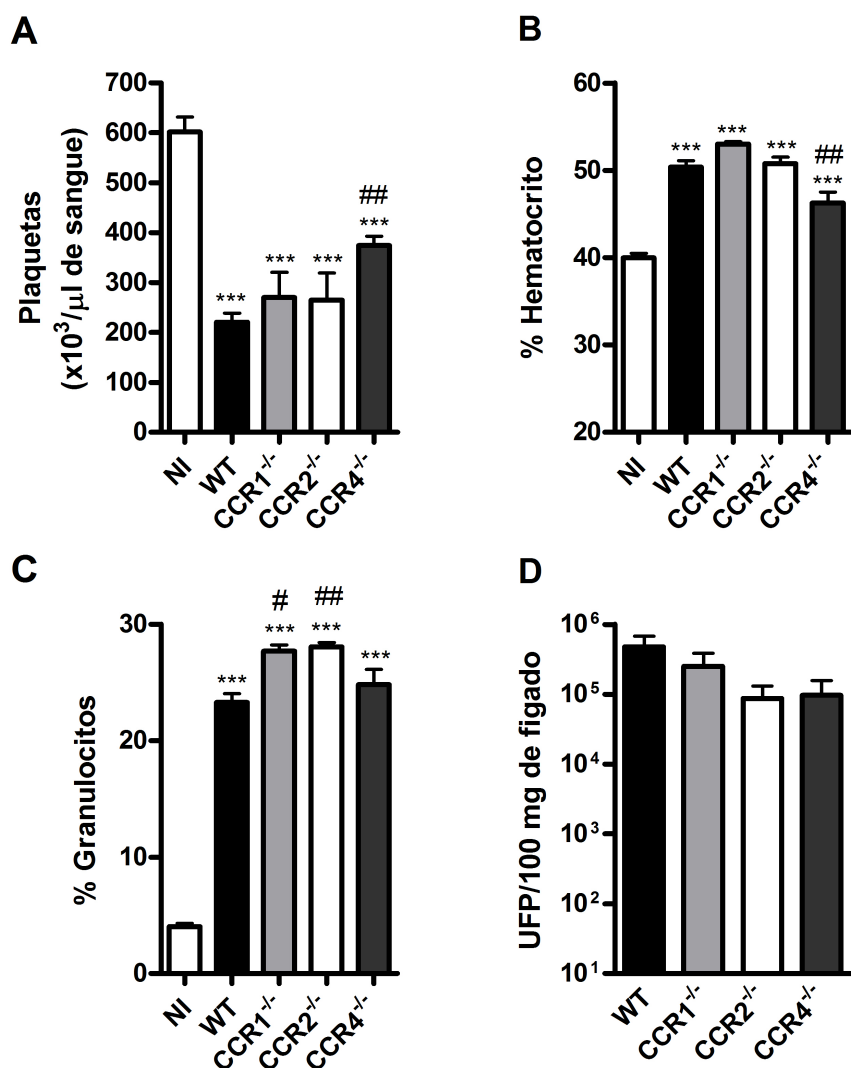
O extravasamento vascular, e conseqüente hemoconcentração, é um evento tardio e comumente observado em pacientes com o quadro de dengue grave (Green e Rothman, 2006; Lee *et al.*, 2006; Srikiatkachorn *et al.*, 2007; Binh *et al.*, 2009; Srikiatkachorn, 2009). A infecção pelo DENV-2 levou a uma hemoconcentração significativa em camundongos WT, como visto pela porcentagem de hematócrito (Figura 12B). Aumento similar foi observado em camundongos CCR1<sup>-/-</sup> e CCR2<sup>-/-</sup> quando comparados ao controle. Apesar de apresentar hemoconcentração, camundongos CCR4<sup>-/-</sup> infectados apresentam redução significativa neste parâmetro quando comparados a camundongos WT infectados (Figura 12B).

Uma importante alteração hematológica observada neste modelo experimental é um aumento significativo da porcentagem de granulócitos circulantes em camundongos WT após infecção, com inicio no dia 4 e pico no dia 6. Neste estudo, camundongos infectados pelo DENV-2 apresentam apreciável aumento na porcentagem de granulócitos circulantes (Figura 12C). De forma interessante, camundongos CCR1<sup>-/-</sup> e CCR2<sup>-/-</sup> infectados apresentam um aumento nesta porcentagem de granulócitos quando comparados aos animais WT controles. Entretanto, esta granulocitose esta significativamente reduzida em animais CCR4<sup>-/-</sup> infectados (Figura 12C). A porcentagem de monócitos circulantes se apresenta

discretamente reduzida em todos os animais infectados estudados e deficientes para CCRs, em comparação a animais WT controles, um dado razoavelmente esperado (dados não mostrados).

Embora os camundongos CCR1<sup>-/-</sup>, CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup> infectados apresentem diferenças significativas na letalidade e nas alterações hematológicas decorrentes da infecção pelo DENV-2, quando comparados a animais WT, incluindo proteção em animais CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup>, não foi observada alteração na carga viral presente no fígado no dia 6 p.i. em animais WT e KO para os receptores em estudo (Figura 12D). O fígado foi escolhido como órgão alvo para estudo do título viral, tanto por ser alvo da doença durante a infecção experimental, gerando lesão, quanto pelo fato de hepatócitos serem alvos clássicos do vírus, onde estes podem se replicar (Jessie *et al.*, 2004; Suksanpaisan *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009; Conceicao *et al.*, 2010). Dados anteriores do grupo sugerem que a replicação viral no fígado e no baço segue o mesmo perfil, com uma cinética bastante próxima, na maioria das vezes independente do fenótipo em estudo (Souza *et al.*, 2009)

Mesmo com as diferenças observadas durante a infecção nas curvas de letalidade, perda de peso e parâmetro hematológicos analisados, não foi observada diferenças entre os níveis basais de cada parâmetro entre camundongos não infectados WT e KO.



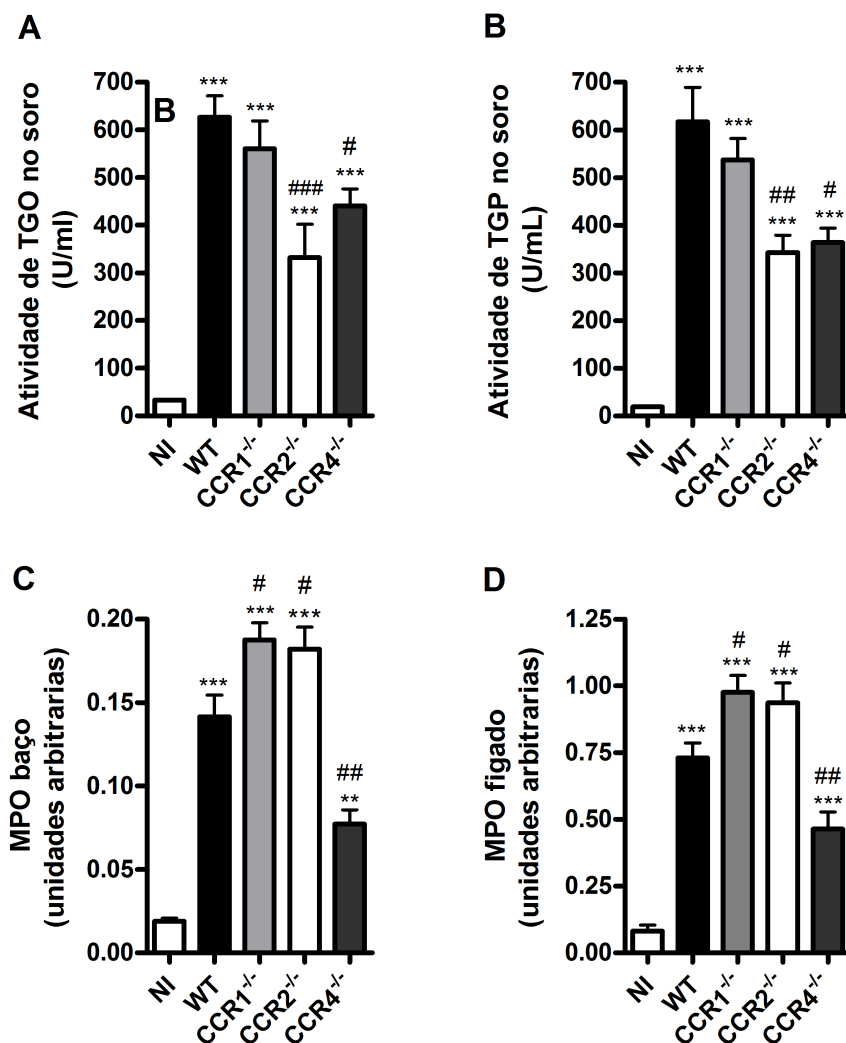
**Figura 12. Alterações hematológicas e carga viral Após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas.** Análise hematológica foi feita no dia 6 p.i. para se avaliar alterações no número de plaquetas (A), porcentagem de hematócrito (B) e porcentagem de granulócitos (C) no sangue de animais não infectados e infectados WT e KO. **Painel D:** Carga viral avaliada no fígado de animais WT e KO no dia 6 p.i. expressa como log de UFP/100 mg de tecido. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais). \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  quando comparado a animais não infectados. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  quando comparado a animais WT infectados. **NI:** animais não infectados.

### 4.3. Inflamação e lesão hepática

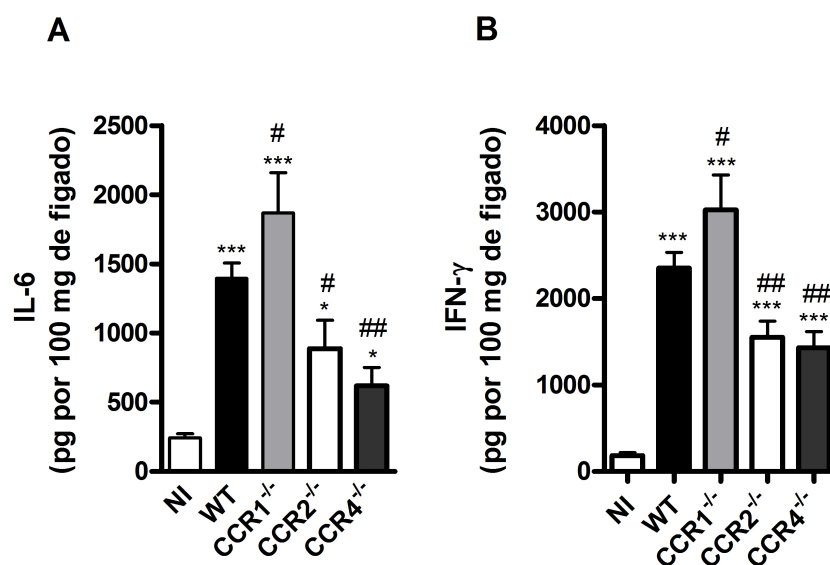
O fígado é um dos órgãos alvo afetados em casos severos de infecção pelo dengue (Gubler, 1998; Suksanpaisan *et al.*, 2007; Martina *et al.*, 2009). A infecção pelo DENV-2 no dia 6 p.i. resultou em um aumento significativo nos níveis séricos das transaminases TGO e TGP em animais WT, marcadores de disfunção hepática (Figura 13A e B). Granulócitos, notadamente neutrófilos, são ativados durante a infecção pelo dengue e podem se acumular e contribuir para lesão em órgão alvos (Juffrie *et al.*, 2000). Existe um acúmulo significativo de neutrófilos no fígado e também no baço de camundongos WT infectados, como avaliado pelos níveis teciduais da enzima MPO (Figura 13C e D). Estas alterações patológicas foram acompanhadas pelo aumento significativo das citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$  no fígado de animais WT após infecção pelo DENV-2, citocinas pró-inflamatórias associadas à infecção (Figura 14A e B).

Cortes histológicos de animais WT infectados mostraram alterações representativas do fenótipo observado, incluindo congestão, focos de hemorragia, degeneração de hepatócitos assim como necrose, levando a alterações patológicas no parênquima hepático (Figura 15).

Em uma visão geral, animais CCR1<sup>-/-</sup> infectados apresentaram grau similar de lesão quando comparados a animais WT, com discreto aumento na atividade de MPO assim como nos níveis de IL-6 e IFN- $\gamma$  no fígado (Figuras 13 e 14). Os cortes histológicos não revelam diferenças apreciáveis (Figura 15). Camundongos CCR2<sup>-/-</sup> infectados também apresentaram níveis elevados de MPO, mas este aumento não parece estar associado a dano hepático, uma vez que os níveis de transaminases hepáticas encontram-se significativamente reduzidos (Figura 13). Estes achados encontram-se associados tanto a uma menor concentração local de IL-6 e IFN- $\gamma$  além de menor lesão hepática avaliada pela histológica, com redução apreciável de áreas de hemorragia e necrose (Figuras 14 e 15). De forma importante, o acúmulo de neutrófilos nos tecidos, assim como os níveis de transaminases e citocinas avaliadas encontram-se significativamente reduzidos em animais CCR4<sup>-/-</sup> infectados, um achado consistente com a reduzida lesão tecidual observada no parênquima hepático destes animais quando comparados a animais WT infectados.

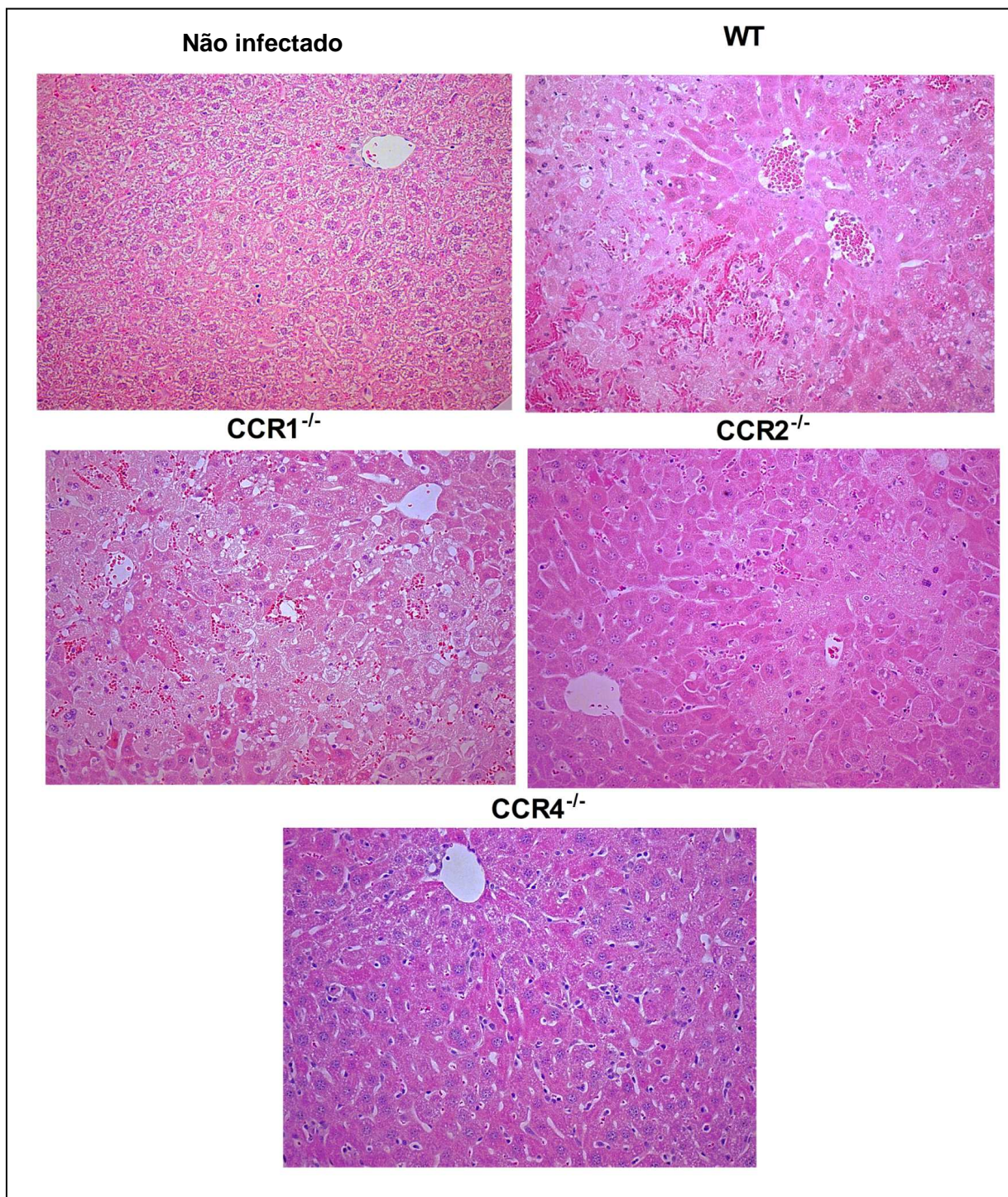


**Figura 13. Níveis de transaminases e acúmulo de neutrófilos no tecido Após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas.** Animais WT e KO foram infectados com 10DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 6 p.i para análise de amostras de sangue e tecido. As transaminases TGO (A) e TGP (B) foram dosados no soro de animais WT e KO, como marcadores de lesão hepática. A atividade de MPO, como índice para o acúmulo de neutrófilos no tecido, foi avaliada no baço e no fígado de animais WT e KO. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais). \*\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 quando comparado a animais não infectados. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 quando comparado a animais WT infectados. **NI:** animais não infectados.



**Figura 14. Produção de citocinas no fígado após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas.** Animais WT e KO foram infectados com 10DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 6 p.i para análise de amostras de tecido. Produção das citocinas IL-6 (A) e IFN- $\gamma$  (B) em homogenato de fígado foi avaliada por ELISA. Os dados estão expressos em pg por 100 mg de tecido. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais). \*\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 quando comparado a animais não infectados. # P < 0.05, ## P < 0.01, quando comparado a animais WT infectados. **NI**: animais não infectados.





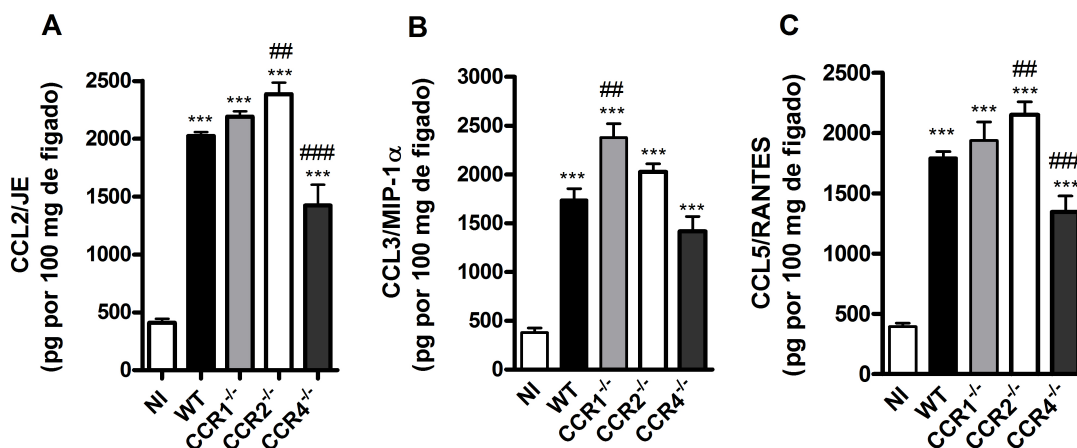
**Figura 15. Alterações histológicas no fígado após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas.** Animais WT e KO foram infectados com 10DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 6 p.i para análise de amostras de tecido. Cortes histológicos corados com HE em animais infectados ou não mostram sinais de congestão, hemorragia, degeneração de hepatócitos e necrose em animais WT, mas em menor grau em animais CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup> infectados. Cada corte apresentado no painel é representativo de pelo menos 15 campos. **Aumento: 400X.**

Os níveis das quimiocinas CCL2/JE, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES e CCL17/TARC foram também avaliadas em amostras de fígado de animais WT e deficientes para os receptores para quimiocinas de interesse após infecção pelo DENV-2. Com a exceção de CCL17, que não apresenta alterações significativas após a infecção (dados não mostrados), houve um aumento significativo das quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 em animais WT, reforçando a importância do sistema de quimiocinas no contexto da infecção pelo dengue (Figura 16A-C). Animais CCR1<sup>-/-</sup> infectados apresentam níveis significativamente aumentados de CCL3 em comparação ao grupo controle. Animais CCR2<sup>-/-</sup> apresentaram um discreto aumento nos níveis de CCL2 e CCL5, dados consistentes com o aumento da atividade de MPO no tecido. Entretanto, níveis das quimiocinas CCL2 e CCL5 encontram-se significativamente reduzidos no fígado de animais CCR4<sup>-/-</sup> (Figura 16).

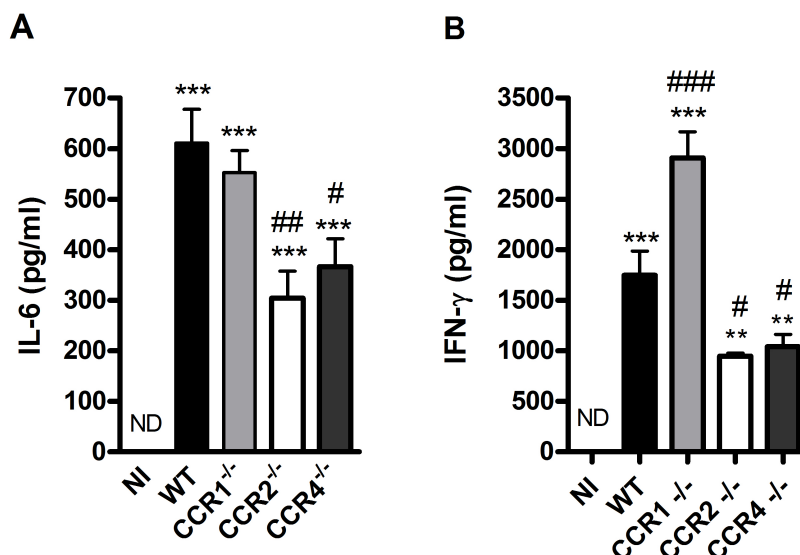
Não foram observadas diferenças entre os níveis basais das citocinas/quimiocinas avaliadas em animais não infectados WT e KO (dados não mostrados).

#### 4.4. Citocinas e quimiocinas na resposta sistêmica

Estudos anteriores demonstraram que as citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$  apresentam níveis sistêmicos elevados em pacientes com dengue ou em modelos experimentais da infecção (Lin *et al.*, 2000; Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Shresta, Kyle, Snider, *et al.*, 2004; Suksanpaisan *et al.*, 2007; Bozza *et al.*, 2008; Kyle *et al.*, 2008; Fink *et al.*, 2009). Desta forma, animais WT infectados pelo DENV-2 apresentaram concentrações bastante elevadas tanto de IL-6 como de IFN- $\gamma$  no soro (Figura 17A e B). Em camundongos CCR1<sup>-/-</sup> infectados, a concentração de IFN- $\gamma$  foi similar a encontrada em controles WT, embora haja um aumento significativo da produção de IL-6 nestes animais. Em animais CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup> infectados os níveis de IL-6 e IFN- $\gamma$  encontram-se significativamente reduzidos (Figura 17), o que vai de acordo com o fenótipo de proteção contra a infecção descrito até o momento para estes animais.



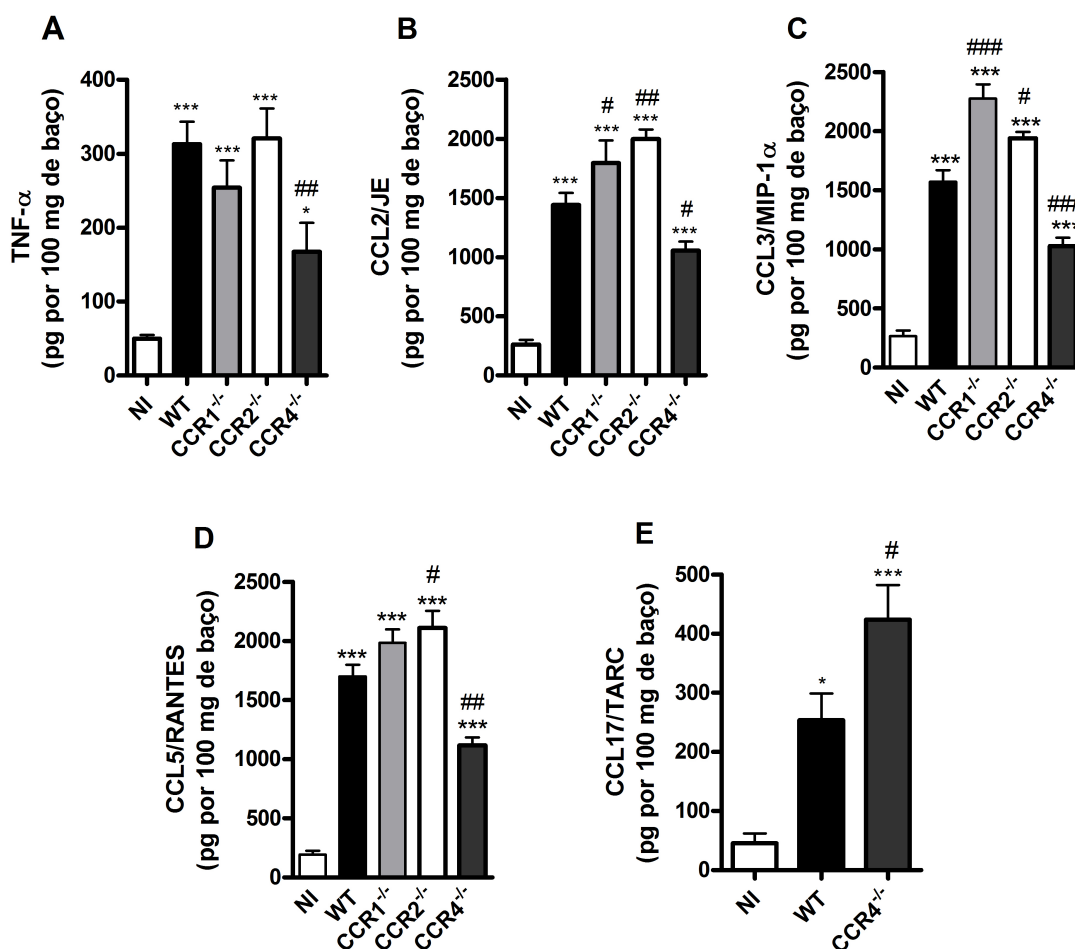
**Figura 16. Produção de quimiocinas no fígado após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas.** Animais WT e KO foram infectados com 10DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 6 p.i para análise de amostras de tecido. Produção das quimiocinas CCL2/JE (A), CCL3/MIP-1 $\alpha$  (B) e CCL5/RANTES (C) em homogenato de fígado foi avaliada por ELISA. Os dados estão expressos em pg por 100 mg de tecido. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais). \*\*\* P < 0.001 quando comparado a animais não infectados. ## P < 0.01, ### P < 0.001, quando comparado a animais WT infectados. **NI**: animais não infectados.



**Figura 17. Produção de citocinas no soro após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas.** Animais WT e KO foram infectados com 10DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 6 p.i para análise de amostras de sangue. Produção das citocinas IL-6 (A) e IFN- $\gamma$  no soro foi avaliada por ELISA. Os dados estão expressos em pg por ml. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais). \*\*P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 quando comparado a animais não infectados. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001, quando comparado a animais WT infectados. **NI**: animais não infectados.

Níveis de TNF- $\alpha$  foram avaliados no baço de animais infectados pelo DENV-2, citocina já demonstrada como importante fator envolvido na fisiopatologia da infecção pelo dengue (Vitarana *et al.*, 1991; Hober *et al.*, 1993; Hober *et al.*, 1996; Atrasheuskaya *et al.*, 2003), principalmente em termos sistêmicos. A produção de quimiocinas de interesse neste estudo também foi avaliada a fim de se obter um panorama conciso da resposta inflamatória sistêmica após infecção. Níveis de outras citocinas no soro não foram avaliados por restrições relativas à quantidade de amostra. O mesmo para o baço, onde em experimentos subseqüentes, análises por citometria de fluxo neste órgão se fizeram necessárias. Entretanto as moléculas de escolha são fatores já relativamente bem associados à infecção objeto de estudo.

Como visto na Figura 18A, os níveis de TNF- $\alpha$  estão significativamente aumentados no baço de animais WT após a infecção experimental. De forma similar, houve um aumento apreciável nos níveis de quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CCL17 em amostras de baço de camundongos WT infectados (Figura 18B-E). Este é também o primeiro relato da literatura a demonstrar a produção da quimiocina CCL17/TARC na infecção pelo dengue, tanto em humanos como em modelos experimentais. CCL2, CCL3, CCL5, além de TNF- $\alpha$ , encontram-se reduzidas no baço de animais CCR4<sup>-/-</sup> infectados quando comparados a animais WT. Confirmando o fenótipo de regulação negativa da resposta inflamatória após infecção neste grupo de animais. Interessantemente, CCL17 apresenta níveis elevados nos animais CCR4<sup>-/-</sup> infectados (Figura 18E), o que corrobora a idéia de receptores de quimiocinas como *scavengers* ou controladores de seus próprios ligantes em condições patológicas (Cardona *et al.*, 2008), fenômeno este observado para os níveis de quimiocinas ligantes de receptores ausentes nos camundongos utilizados no presente estudo. Os níveis de TNF- $\alpha$  foram similares aos encontrados em camundongos CCR1<sup>-/-</sup> e CCR2<sup>-/-</sup> infectados quando comparados a camundongos WT. Alterações menores mais significativas foram observadas no que diz respeito à concentração de quimiocinas. Níveis de CCL3 encontram-se elevados no baço de animais CCR1<sup>-/-</sup> infectados, enquanto níveis de CCL2 e CCL5 encontram-se elevados no baço de animais CCR2<sup>-/-</sup> infectados, sempre quando comparados aos níveis observados em animais WT. O maior aumento de CCL3 em animais CCR1<sup>-/-</sup>, e de CCL2 e CCL5 em animais CCR2<sup>-/-</sup> podem explicar o acúmulo de neutrófilos no baço (Figura 13D), mesmo que o fenótipo final, como para CCR2<sup>-/-</sup>, não reflita a resposta global de proteção contra a infecção.



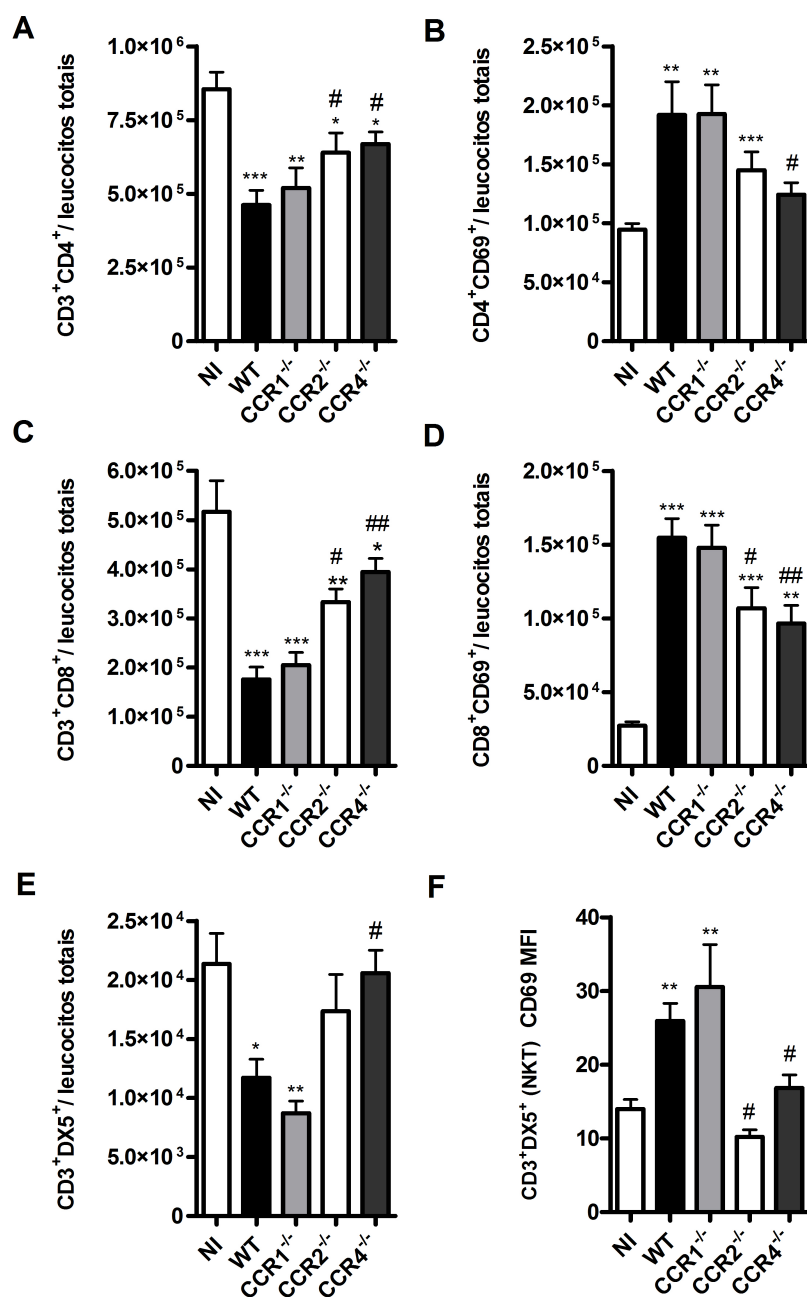
**Figura 18. Produção de citocinas quimiocinas no baço após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas.** Animais WT e KO foram infectados com 10DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 6 p.i para análise de amostras de tecido. Produção da citocina TNF- $\alpha$  (A) e quimiocinas CCL2/JE (B), CCL3/MIP-1 $\alpha$  (C) e CCL5/RANTES (D) em homogenato de baço foi avaliada por ELISA. Os dados estão expressos em pg por 100 mg de tecido. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais). \*P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 quando comparado a animais não infectados. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001, quando comparado a animais WT infectados. **NI**: animais não infectados.

Já foi sugerido que, em determinadas respostas inflamatórias, neutrófilos podem ser recrutados para o sítio inflamatório através de CCR1, CCR2 ou CCR5 (Cheng *et al.*, 2001; Reichel *et al.*, 2006; Furuichi *et al.*, 2008). Não foram observadas diferenças entre os níveis basais das citocinas/quimiocinas avaliadas em animais não infectados WT e KO (dados não mostrados).

#### 4.5. Número e ativação de leucócitos no baço após infecção pelo DENV-2

Em seguida avaliamos no dia 6 p.i. o número e perfil de leucócitos no baço de camundongos WT e deficientes para os receptores para quimiocinas em estudo após a infecção pelo DENV-2. Em termos gerais, a infecção experimental levou a um aumento significativo no número total de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, além de células NKT (CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>) no baço de animais WT infectados quando comparados a animais não infectados (Figura 19A, C e E). Embora haja redução no número total de leucócitos, células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e NKT ativadas, como avaliado pela expressão do marcador de ativação CD69, se encontram aumentadas no baço de camundongos infectados (Figura 19B, D e F). Esta linfopenia decorrente da infecção, esta provavelmente relacionada à saída e/ou recirculação de células no baço em direção a outros órgãos (ex: fígado), um fenômeno comumente observado no presente modelo experimental, assim como a internalização do TCR.

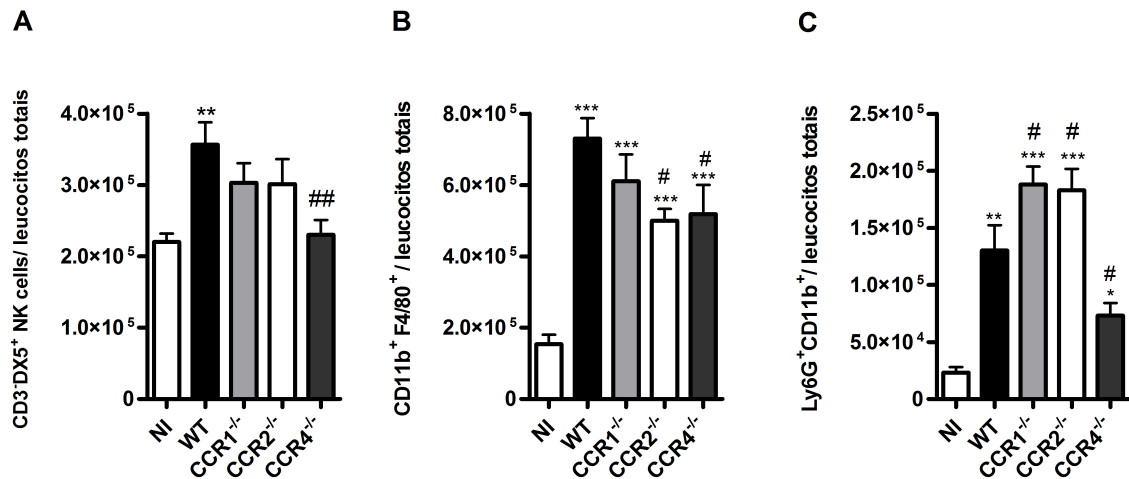
Perfil similar foi observado em camundongos CCR1<sup>-/-</sup> infectados, tanto para a linfopenia como para o perfil de ativação, quando comparados a animais WT. Em contraste, animais CCR2<sup>-/-</sup> e CCR4<sup>-/-</sup> infectados apresentam uma reversão parcial do fenótipo observado em animais WT. Uma menor redução de células T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e NKT, assim como um menor perfil de ativação, foram parâmetros significativamente diferentes nestes animais (Figura 19).



**Figura 19. Leucócitos e perfil de ativação após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas.** Animais WT e KO foram infectados com 10DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 6 p.i. Leucócitos esplênicos foram marcados com anticorpos específicos. Citometria de fluxo, de acordo com tamanho e granulosidade, foi tomada como análise. O número absoluto das populações foi calculado em função do número total de leucócitos. Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A) e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (C) foram avaliados em animais WT e KO infectados, assim como células CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup> NKT (E). O perfil de ativação destes tipos celulares foi avaliado pela expressão de CD69 para células CD4<sup>+</sup> (B), CD8<sup>+</sup> (D), e NKT (F). Resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais). \*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 quando comparado a animais não infectados. # P < 0.05, ## P < 0.01, quando comparado a animais WT infectados. **NI**: animais não infectados. **MFI**: Intensidade de fluorescência média.

Em contraste à linfopenia observada essencialmente pela queda no número de células T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e NKT, a infecção pelo DENV-2 levou ao aumento de células relacionadas à imunidade inata como NK (CD3<sup>-</sup>DX5<sup>+</sup>), macrófagos (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) e neutrófilos (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) no baço de animais WT (Figura 20A-C). De forma similar aos achados anteriores, camundongos CCR1<sup>-/-</sup> infectados apresentaram perfil celular semelhante ao observado em animais WT, com exceção de um maior número de neutrófilos no baço. Os dados referentes à população de neutrófilos no baço vão, inclusive, de acordo com os achados referentes à atividade de MPO neste tecido (Figura 13). Camundongos CCR2<sup>-/-</sup> infectados apresentaram diferenças discretas quanto ao número das células analisadas em relação a animais WT, apesar de apresentarem uma significativa redução no número de macrófagos (Figura 20B). Isto vai de acordo com o importante papel do receptor CCR2 no recrutamento de monócitos/macrófagos (Mantovani, 1999; Zlotnik e Yoshie, 2000; Locati *et al.*, 2002). Já os camundongos CCR4<sup>-/-</sup> apresentaram redução dos 3 tipos celulares aqui avaliados, corroborando o perfil de resposta linfocítica (Figura 19). Não foram observadas diferenças no perfil de ativação de células NK (CD3<sup>-</sup>DX5<sup>+</sup>), como avaliado por CD69 entre os grupos de camundongos estudados (dados não mostrados). Como dado complementar, a ativação de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>), avaliada pela expressão de CD86, apresenta aumento em animais WT infectados mas se apresenta significativamente reduzida em camundongos CCR4<sup>-/-</sup> (dados não mostrados), mais uma vez sugerindo um fenótipo pró-inflamatório reduzido neste grupo de animais.





**Figura 20. Perfil de células NK, macrófagos e neutrófilos após infecção pelo DENV-2 em animais WT ou KO para receptores de quimiocinas.** Animais WT e KO foram infectados com 10DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 6 p.i. Leucócitos esplênicos foram marcados com anticorpos específicos. Citometria de fluxo, de acordo com tamanho e granulosidade, foi tomada como análise. O número absoluto das populações foi calculada em função do número total de leucócitos. Células NK CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup> (A), macrófagos CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> (B) e neutrófilos infiltrados CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> (C) foram avaliados em animais WT e KO infectados. Resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais). \*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 quando comparado a animais não infectados. # P < 0.05, ## P < 0.01, quando comparado a animais WT infectados. NI: animais não infectados.

## OBJETIVO 2

### **PAPEL DELETÉRIO DAS CELULAS NKT INVARIANTES (iNKT) NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO VIRUS DA DENGUE**

#### **4.6. Ativação de células iNKT durante a infecção pelo DENV-2**

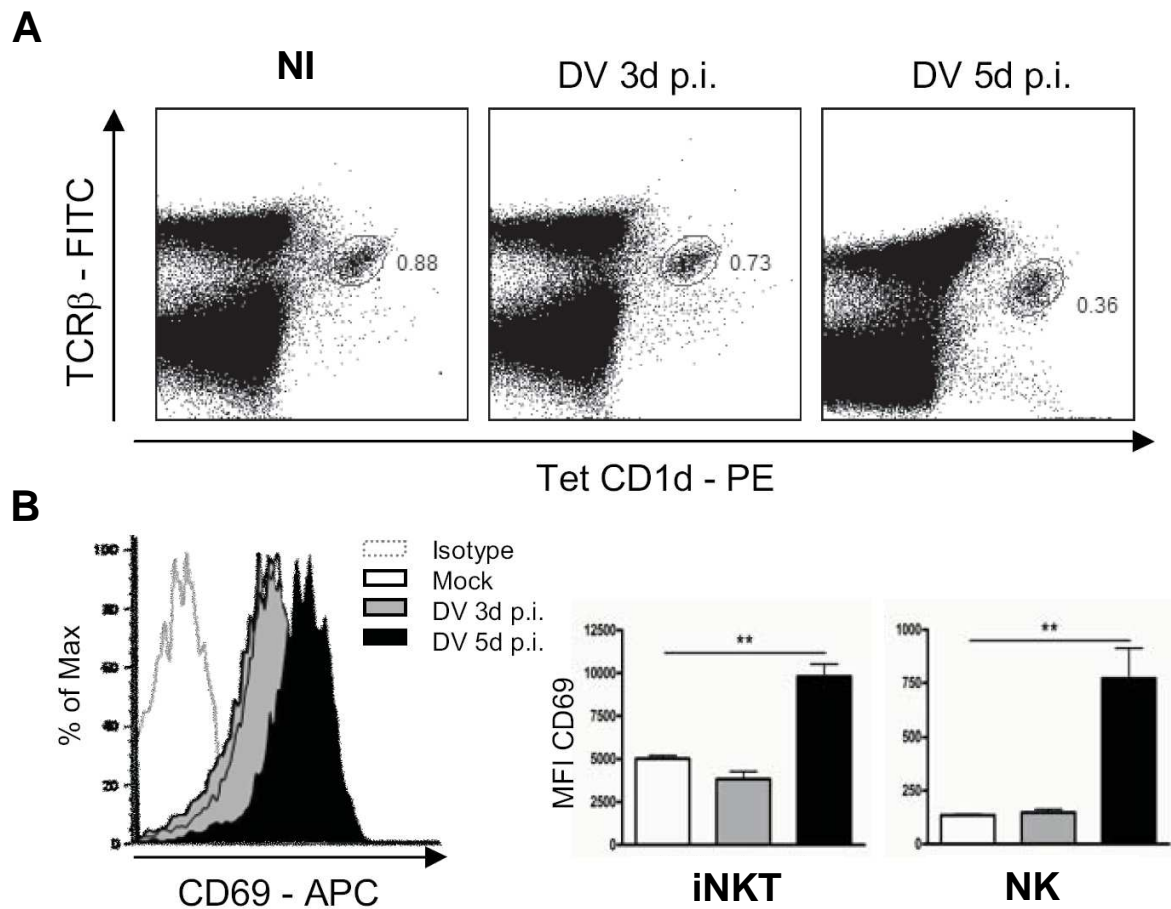
Uma das importantes características das células iNKT é sua rápida ativação a fim de iniciar sua participação na resposta imune inata e adaptativa. Perguntamos se estas células participavam e tornavam-se mais ativadas na infecção experimental pelo DENV-2 em camundongos WT. Como observado na Figura 21A, a frequência e o número absoluto (dados não mostrados) de células iNKT esplênicas permanecem estáveis em comparação a animais WT controle (células tetrâmero CD1d carregado com PBS-57<sup>+</sup> e TCR $\beta$ <sup>+</sup>) no dia 3 p.i., considerando-se o início da doença em termos inflamatórios. Entretanto, há uma queda de aproximadamente 50% na frequência destes tipos celulares no dia 5 p.i., característico da linfopenia observada e citada no **Objetivo 1**. Esta redução na frequência de células iNKT durante a infecção é comumente observada a fenômenos de ativação dependente de TCR e também decorrente da internalização do TCR (Parekh *et al.*, 2005; Chiba *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008).

O dia 5 p.i foi escolhido para análise por citometria de fluxo no presente trabalho em função do inóculo (3 vezes maior do que o inóculo utilizado no **Objetivo 1**, além de que foi o momento onde observamos sinais clínicos da doença grave associado a uma maior taxa de letalidade para os camundongos em estudo. O dia 6 p.i. foi considerado, por exemplo, para a maioria das análises de mediadores inflamatórios e histologia). Importante frisar, que, no presente modelo experimental, há uma evidente esplenomegalia observada em animais infectados, com aumento do número de células no baço em relação a animais não infectados. Entretanto, em diversos trabalhos do grupo, ao se observar diferenças apreciáveis entre animais WT e deficientes para moléculas em estudo, mesmo havendo fenótipo de piora ou mesmo de melhora em alguns casos, esta esplenomegalia e o aumento do número de células parecem estar diretamente associados ao influxo de neutrófilos e macrófagos, além de edema.

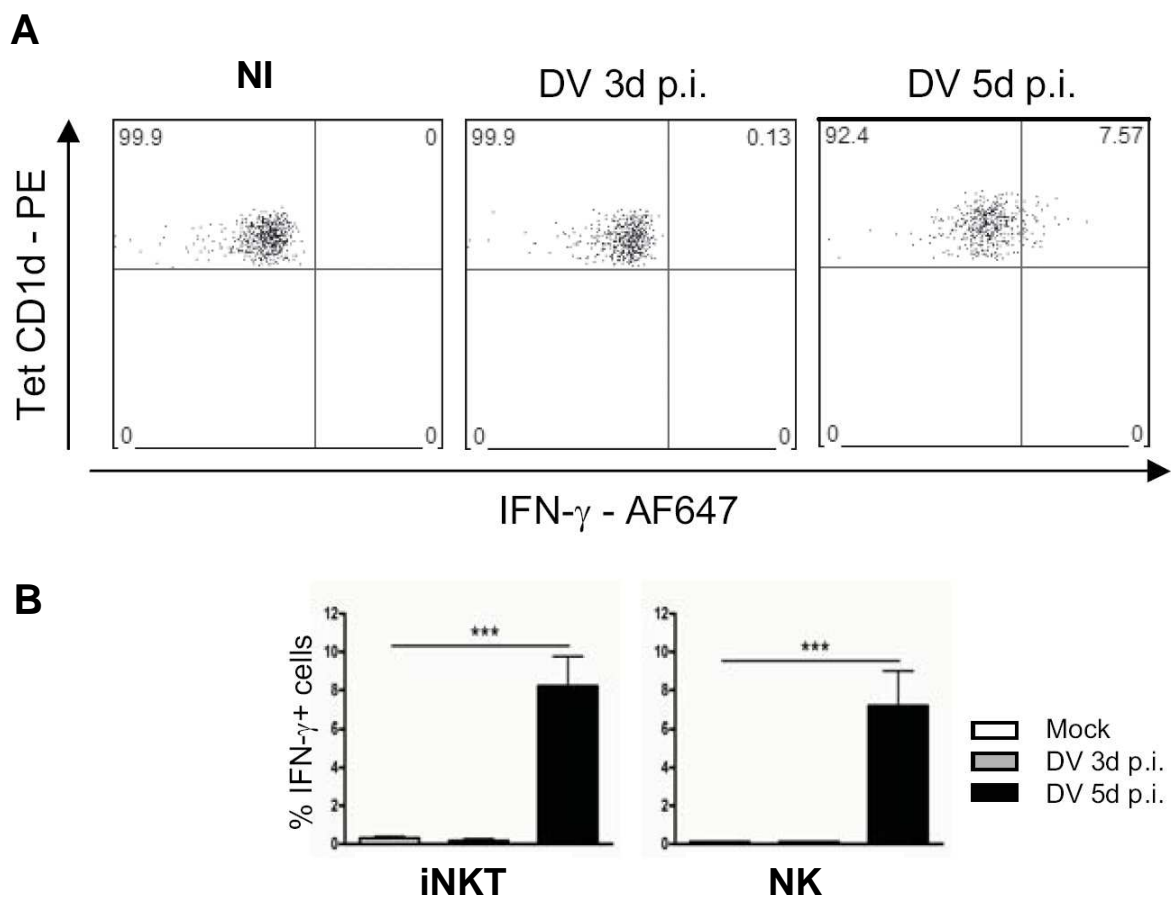
A fim de se estudar o perfil de ativação de células iNKT, investigamos a expressão de um marcador de ativação inicial em células linfocíticas, a molécula CD69. Na Figura 21B, o nível de expressão de CD69 em células iNKT foi significativamente aumentado no dia 5 p.i., não sendo observadas diferenças de ativação no dia 3 p.i. De forma importante, células NK ( $CD5^- NK1.1^+$ ) também apresentaram a mesma cinética de ativação por CD69 (Figura 21B).

Durante infecções, células iNKT estão entre as primeiras células a produzir citocinas que podem exercer efeitos diversos em células imunes e não-imunes (residentes em geral, incluindo fibroblastos e células endoteliais)(Kim *et al.*, 2008; Tyznik *et al.*, 2008). Desta forma, investigamos se células iNKT expressavam citocinas comumente associadas ao fenótipo Th1 e/ou Th2, especificamente IFN- $\gamma$  e IL-4, durante o modelo de infecção experimental pelo dengue. Comparado a animais controles não infectados, a infecção pelo DENV-2 levou a um aumento da frequência de células iNKT produtoras de IFN- $\gamma$ , mas não de IL-4 (dados não mostrados) no dia 5 p.i. (Figura 22A). Em contraste, no dia 3 p.i. as células iNKT permanecem negativas para a produção de IFN- $\gamma$ , como avaliado por citometria de fluxo. De forma similar, células NK também expressam IFN- $\gamma$  intracelular no dia 5 p.i. (Figura 22B) mas não no dia 3. Dados similares foram obtidos para células iNKT e NK isoladas do fígado de animais WT infectados nos dias 3 e 5 p.i. (dados não mostrados).

Juntos estes dados sugerem que a infecção pelo DENV-2 leva a uma ativação sistêmica de células iNKT no dia 5 p.i., momento este que precede o dia onde a maioria dos animais apresentam mortalidade máxima, além de sinais clínicos da doença grave, refletindo o pico da replicação viral no dia 6 p.i. (a ser discutido posteriormente).



**Figura 21. Ativação de células iNKT durante a infecção pelo DENV-2.** Animais WT foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados nos dias 3 e 5 p.i. Leucócitos esplênicos foram marcados com anticorpos específicos. Citometria de fluxo, de acordo com tamanho e granulosidade, foi tomada como análise. **Painel A:** Frequência de células iNKT (Tetrâmero CD1d<sup>+</sup> TCRβ<sup>+</sup>) no baço de animais não infectados ou infectados com DENV-2. **Painel B:** Expressão do marcador de superfície CD69 nas células iNKT ou NK (CD5<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) marcadas nos dias 3 e 5 p.i. Histogramas de barras representam a expressão do marcador em animais não infectados ou infectados pelo DENV-2 como expresso por MFI. Resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=4 animais). \*\* P < 0.01 quando comparado a animais não infectados. **NI:** animais não infectados ou *mock*. **MFI:** Intensidade de fluorescência média.



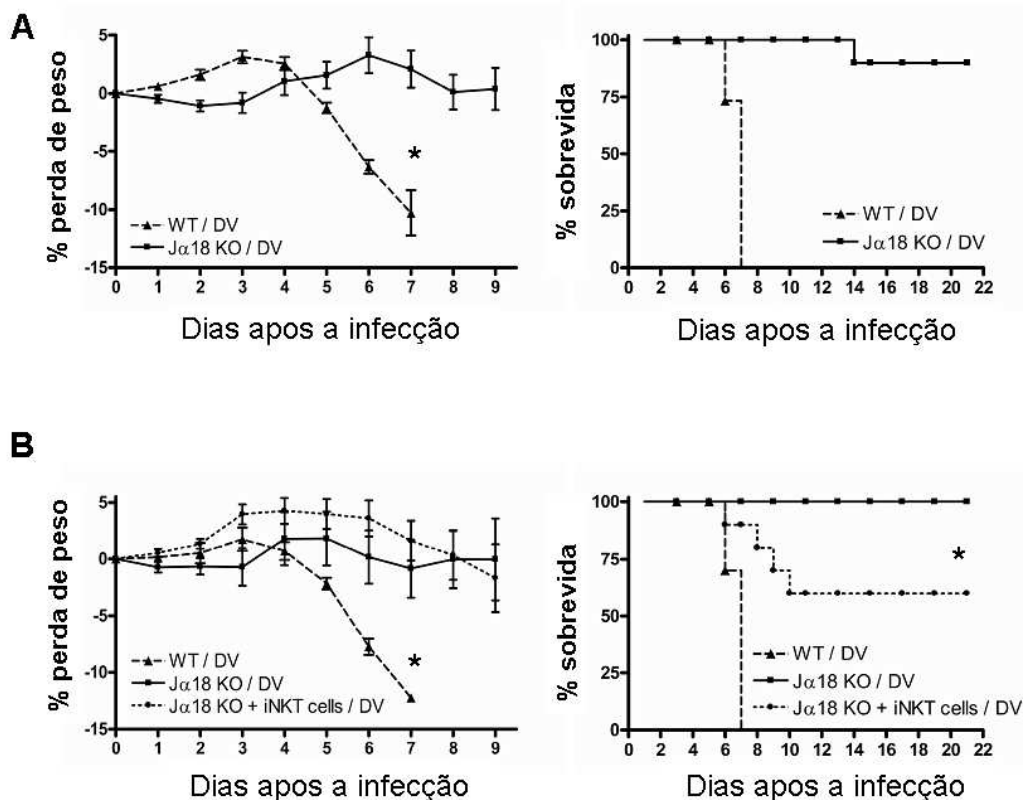
**Figura 22. Produção de IFN- $\gamma$  por células iNKT e NK durante a infecção pelo DENV-2.** Animais WT foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados nos dias 3 e 5 p.i. Leucócitos esplênicos foram marcados com anticorpos específicos. Citometria de fluxo, de acordo com tamanho e granulosidade, foi tomada como análise. **Painel A:** Produção de IFN- $\gamma$  intracelular por células iNKT esplênicas (Tetrâmero CD1d<sup>+</sup> TCR $\beta$ <sup>+</sup>) em animais não infectados ou infectados com DENV-2. Populações definidas quando comparadas ao isotipo controle. **Painel B:** Porcentagem de células iNKT ou NK (CD5<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) marcadas nos dias 3 e 5 p.i. positivas para IFN- $\gamma$ . Histogramas de barras representam a porcentagem de populações positivas para a citocina em animais não infectados ou infectados pelo DENV-2. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=4-10 animais). \*\*\* P < 0.001 quando comparado a animais não infectados. NI: animais não infectados ou *mock*.

#### 4.7. Mortalidade e perda de peso em camundongos deficientes para células iNKT ( $J\alpha 18^{-/-}$ ) ou para CD1d.

Como citado anteriormente, o presente modelo constitui uma ótima ferramenta para o estudo da imunopatologia da infecção pelo dengue dadas as similaridades com os fenômenos observados na clínica (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2009; Assuncao-Miranda *et al.*, 2010). A trombocitopenia, extravasamento vascular e exacerbação da resposta inflamatória sistêmica foram previamente discutidos (**Objetivo 1**). O choque e letalidade associados à infecção, eventualmente presentes na FHD/SCD em humanos, se torna a base do presente grupo de estudos.

Para identificar um potencial papel de células iNKT no desenvolvimento e/ou controle da imunopatologia, camundongos WT,  $J\alpha 18^{-/-}$  e  $CD1d^{-/-}$  (deficientes em uma molécula fundamental envolvida na apresentação de antígeno para NKTs) foram infectados com uma dose de  $30DL_{50}$  da amostra adaptada de DENV-2 e monitorados diariamente para avaliação da mortalidade e perda de peso associadas a infecção. Como visto na Figura 23A, camundongos WT infectados apresentaram rápida perda de peso, começando no dia 4 p.i., com todos os camundongos sucumbindo a infecção entre os dias 6 e 7 p.i. De forma interessante, camundongos deficientes para células iNKT ( $J\alpha 18^{-/-}$ ) não apresentam perda de peso significativa e sobrevivem até 22 dias Após a infecção (Figura 23A,  $p < 0.01$ ).

Para se comprovar o envolvimento de células iNKT na mortalidade associada a infecção pelo DENV-2, camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  foram reconstituídos com células iNKT purificadas do fígado de animais WT e então infectados com  $30DL_{50}$  de DENV-2. Como observado na Figura 23B, apenas 40% dos animais  $J\alpha 18^{-/-}$  que receberam células iNKT sucumbiram a infecção entre os dias 6 e 10 p.i quando comparados a  $J\alpha 18^{-/-}$  não reconstituídos ( $p=0.0291$ ), não havendo inclusive perda de peso significativa. Importante ressaltar que esta reversão considerada parcial, e não completa, pode ocorrer devido aos vários fatores que podem interferir nesta repopulação de células iNKT, incluindo órgãos alvo após a transferência e estado de ativação, sem excluir apoptose.



**Figura 23. Variação do peso corporal e mortalidade induzida pelo DENV-2 em animais WT e deficientes para iNKT ( $J\alpha 18^{-/-}$ ).** Painel A: Camundongos WT ou  $J\alpha 18^{-/-}$  do mesmo sexo e idade foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e monitorados diariamente para avaliação da mortalidade e perda de peso. À esquerda, perda de peso expressa como a porcentagem de peso em comparação ao peso inicial do animal. À direita, porcentagem de sobrevivência de camundongos WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  após infecção. Painel B: À esquerda, variação do peso corporal e mortalidade em camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  reconstituídos ou não com células iNKT ( $1 \times 10^6$  células/animal) 18 horas antes da infecção. À direita, porcentagem de sobrevivência de animais WT,  $J\alpha 18^{-/-}$  ou  $J\alpha 18^{-/-}$ -reconstituídos. Resultados para a perda de peso foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0.05$ . Todos os dados são representativos de pelo menos 2 experimentos ( $n=10-25$  animais).

Complementar a estes achados, camundongos deficientes para a molécula CD1d apresentaram mortalidade e perda de peso similar a animais WT ( $P=0,1053$ ) Após infecção pelo DENV-2 (Figura 24). Sugerindo que provavelmente o papel de células vNKT é adicional ou antagônico ao desempenhado por células iNKT. Estes últimos dados confirmam o fenótipo encontrado em animais  $J\alpha18^{-/-}$  e sugere o importante papel de células iNKT na resposta a infecção, um achado inédito no que diz respeito à associação das células iNKT com a fisiopatologia do dengue.

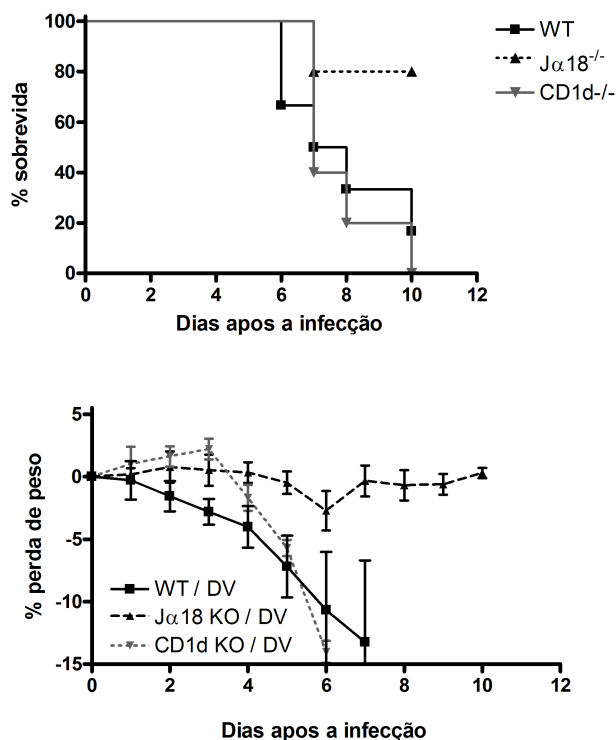
#### **4.8. Camundongos $J\alpha18^{-/-}$ desenvolvem doença menos grave após a infecção**

A hemoconcentração, importante alteração hematológica associada ao extravasamento vascular decorrente da inflamação, foi observada tanto em camundongos WT e  $J\alpha18^{-/-}$  entre os dias 4 e 6 p.i. a fim de se validar o modelo e identificar o fenótipo protetor anteriormente observado em  $J\alpha18^{-/-}$ . De forma importante, camundongos  $J\alpha18^{-/-}$  apresentaram redução importante da hemoconcentração no dia 6 p.i., momento de maior gravidade na infecção experimental, associado à grande mortalidade e morbidade. O hematócrito permanece em níveis basais nestes animais em todos os pontos avaliados. (Figura 25). Considerando-se a trombocitopenia e sua importante correlação com a clínica em pacientes infectados, observamos na Figura 26A uma queda significativa no número de plaquetas em camundongos WT e  $J\alpha18^{-/-}$  no dia 5 p.i., embora no grupo de animais deficientes para iNKT esta queda foi menos expressiva.

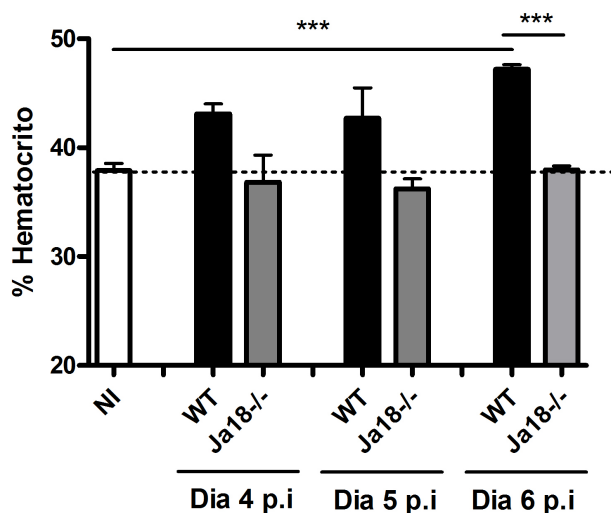
A frequência de granulócitos e outras populações de células circulantes tendem a se alterar durante a infecção pelo dengue, podendo inclusive estar associada tanto com leucopenia como com leucocitose (Gubler, 1998; Green e Rothman, 2006). Camundongos WT infectados apresentam aumento significativo na frequência de granulócitos quando comparados a animais controle. Este aumento não foi observado no sangue de animais  $J\alpha18^{-/-}$  durante a infecção pelo DENV-2 (Figura 26A). Não foram observadas diferenças apreciáveis nas frequências de monócitos e linfócitos entre camundongos WT e  $J\alpha18^{-/-}$  infectados (Figura 26B).

Não foram observadas diferenças entre os níveis basais dos parâmetros hematológicos avaliados em animais não infectados WT e KO (dados não mostrados).

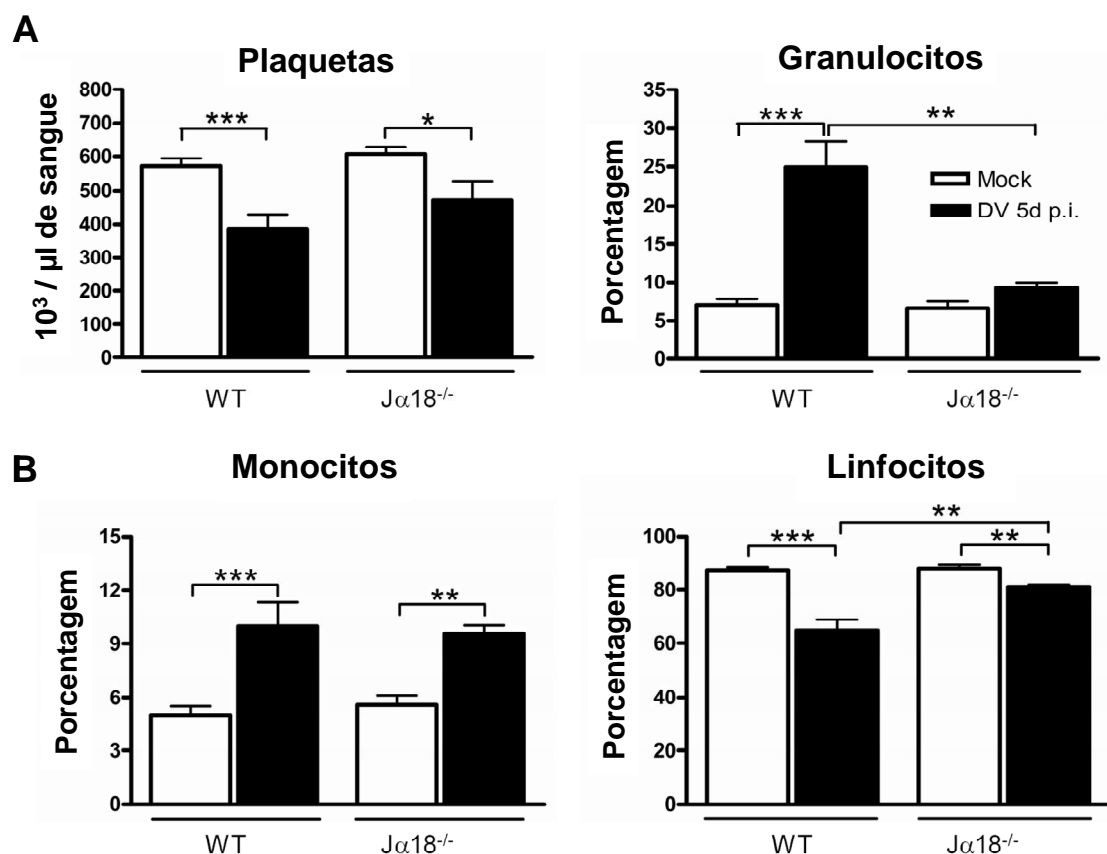




**Figura 24. Variação do peso corporal e mortalidade induzida pelo DENV-2 em animais WT e deficientes para CD1d.** Camundongos WT ou CD1d<sup>-/-</sup> do mesmo sexo e idade foram infectados com 30DL<sub>50</sub> DENV-2 e monitorados diariamente para avaliação da mortalidade e perda de peso. **No alto:** porcentagem de sobrevivida de camundongos WT e Jα18<sup>-/-</sup> após infecção. **Embaixo:** A perda de peso foi expressa como a porcentagem de peso em comparação ao peso inicial do animal.



**Figura 25. Cinética de hemoconcentração Após infecção pelo DENV-2 em animais WT e Jα18<sup>-/-</sup>.** Análise hematológica foi feita nos dias 4, 5 e 6 p.i. com 30 LD<sub>50</sub> de DENV-2 para se avaliar alterações na porcentagem de hematócrito no sangue de animais não infectados e infectados WT e KO. Resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais). \*\*\* P < 0.001. NI: animais não infectados.



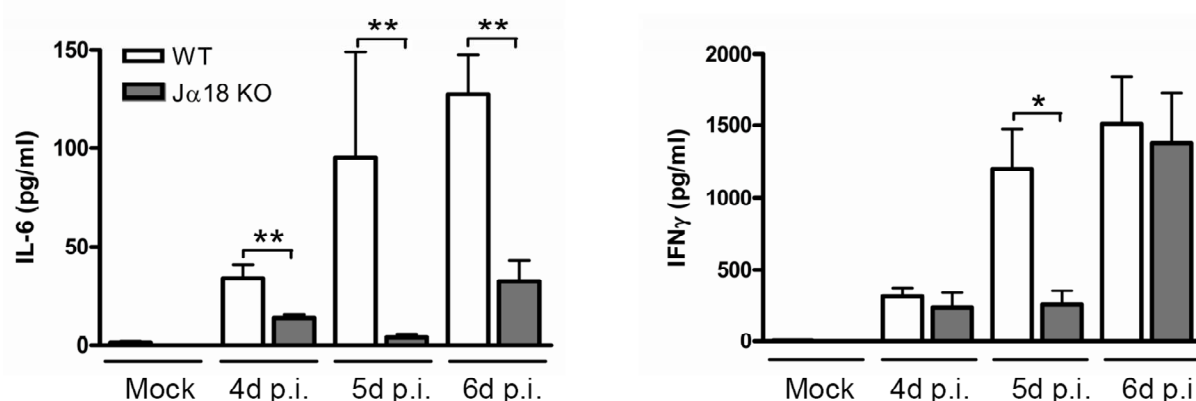
**Figura 26. Alterações hematológicas após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$ .** **Painel A:** Análise hematológica foi feita no dia 5 p.i. com 30 LD<sub>50</sub> de DENV-2 para se avaliar alterações no número de plaquetas (A) e porcentagem de granulócitos (B) no sangue de animais não infectados e infectados WT e KO. **Painel B:** Porcentagem de monócitos (C) e linfócitos (D) no sangue de animais não infectados e infectados WT e KO. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=6-11 animais). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . **mock:** animais não infectados. **Branco:** WT. **Preto:** DENV-2 dia 5 p.i..

O próximo passo foi associar a redução de mortalidade e alterações hematológicas observadas em animais  $J\alpha 18^{-/-}$  com uma possível alteração na forte resposta inflamatória associada à infecção. Como visto na Figura 27, os níveis séricos de IL-6 e IFN- $\gamma$  se encontram bastante aumentados entre os dias 4 e 6 p.i. em animais WT. De forma importante, observamos uma redução significativa do nível destas citocinas no soro de animais  $J\alpha 18^{-/-}$ , especialmente IL-6, sugerindo uma menor resposta inflamatória sistêmica frente à infecção

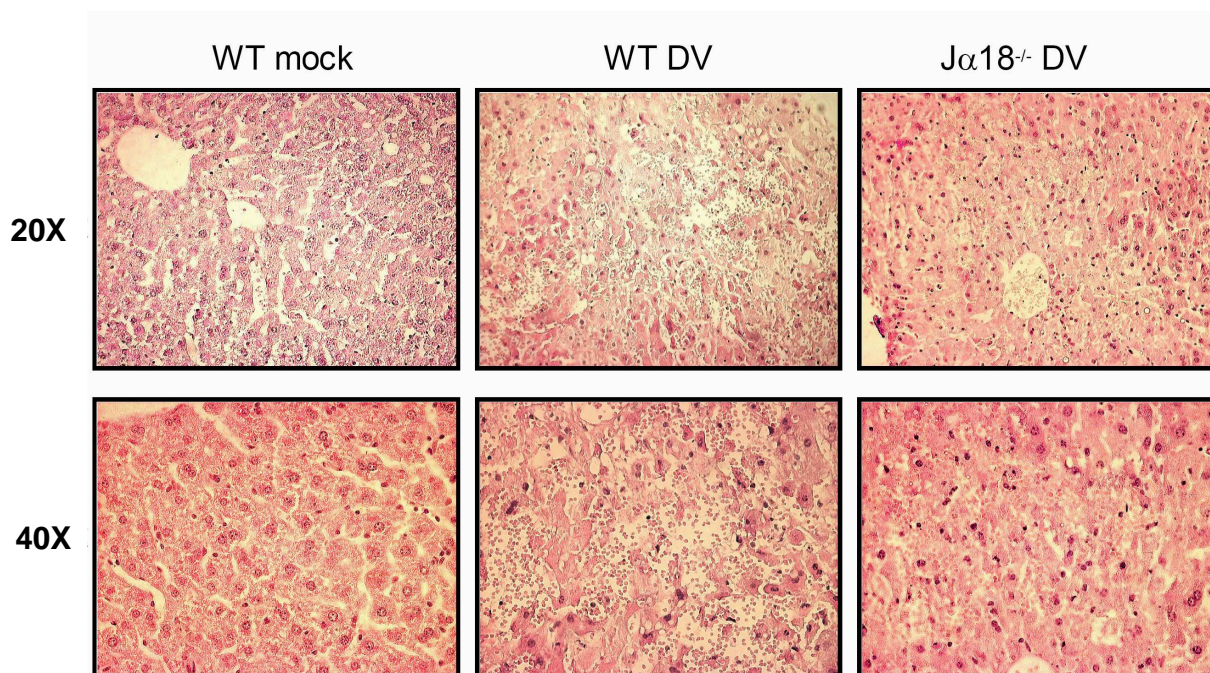
Para se visualizar a extensão da lesão tecidual decorrente da infecção grave pelo dengue, o fígado de animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  foi analisado no dia 6 p.i. A coloração por HE revelou claros sinais de hemorragia e degeneração de hepatócitos por todo o parênquima hepático. Congestão e focos de necrose foram também evidenciados. Nos animais  $J\alpha 18^{-/-}$  infectados estas alterações histopatológicas foram significativamente menos evidentes, com apenas algumas regiões de hemorragia e ainda algum infiltrado inflamatório (Figura 28). Em conjunto estes dados sugerem que células iNKT contribuem significativamente para a mortalidade, resposta inflamatória sistêmica e dano tecidual associados a infecção experimental pelo DENV-2.

#### **4.9. Camundongos $J\alpha 18^{-/-}$ apresentam menor produção de citocinas pro-inflamatórias**

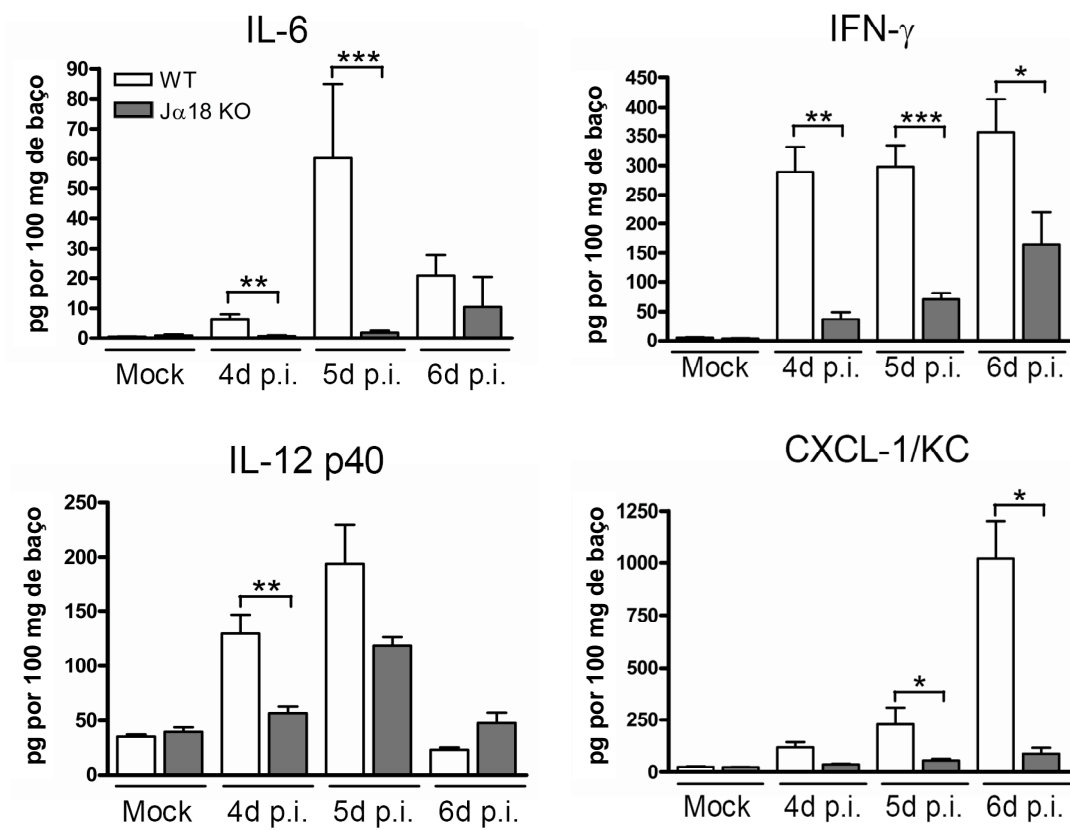
Em face da *cytokine storm*, ou produção exacerbada de citocinas observada durante a infecção pelo dengue, normalmente correlacionada com a gravidade da doença em pacientes (Martina *et al.*, 2009), investigamos a produção de citocinas pro-inflamatórias no baço de animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  infectados. Como visto na Figura 29, foi observado um aumento significativo da produção das citocinas IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-12p40 em animais WT entre os dias 4 e 6 p.i., importantes citocinas também envolvidas na resposta dirigida por iNKT em infecções (Matsumoto *et al.*, 2000; Nagarajan e Kronenberg, 2007). O mesmo foi observado para o nível de expressão de IFN- $\gamma$  e IL-12p40 por QPCR (dados não mostrados).



**Figura 27. Produção de citocinas no soro após infecção pelo DENV-2 em animais WT e Jα18<sup>-/-</sup>.** Animais WT e KO foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados entre os dias 4 e 6 p.i para análise de amostras de sangue. Produção das citocinas IL-6 e IFN-γ no soro foi avaliada por ELISA. Os dados estão expressos em pg por ml. Resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=6-11 animais). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01. **mock**: animais não infectados. **Branco**: WT. **Cinza**: KO.



**Figura 28. Alterações histológicas no fígado após infecção pelo DENV-2 em animais WT e Jα18<sup>-/-</sup>.** Animais WT e KO foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 6 p.i para análise de amostras de tecido. Cortes histológicos corados com HE em animais infectados ou não mostram sinais de congestão, hemorragia, degeneração de hepatócitos e necrose em animais WT, mas em menor grau em animais Jα18<sup>-/-</sup>. Cada corte apresentado no painel é representativo de pelo menos 15 campos. Aumento: 20X e 40X. **mock**: animais não infectados.

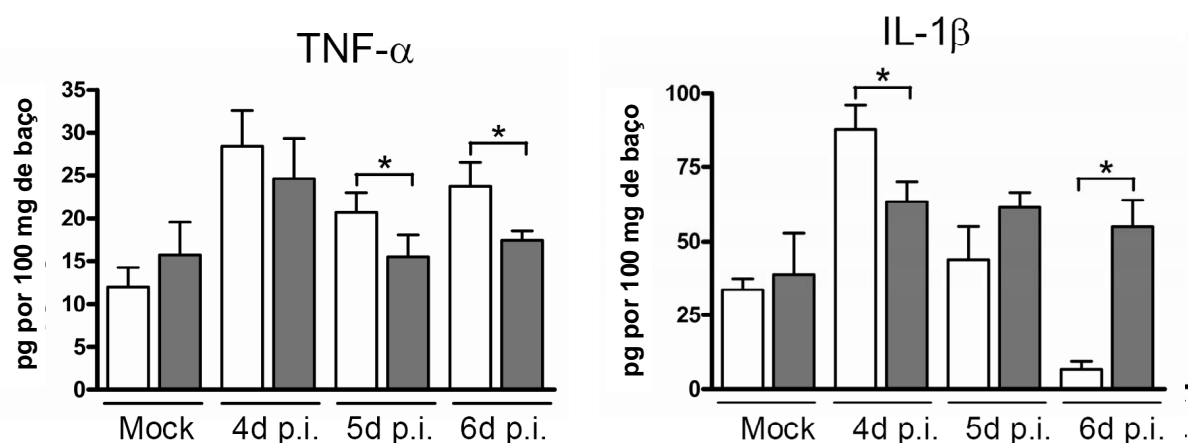


**Figura 29. Produção de citocinas e quimiocinas no baço após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$ .** Animais WT e KO foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados entre os dias 4 e 6 p.i para análise de amostras de tecido. Produção da citocina IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-12p40, CXCL1/KC em homogenato de baço foi avaliada por ELISA. Os dados estão expressos em pg por 100 mg de tecido. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=4-8 animais). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . **mock:** animais não infectados. **Branco:** WT. **Cinza:** KO.

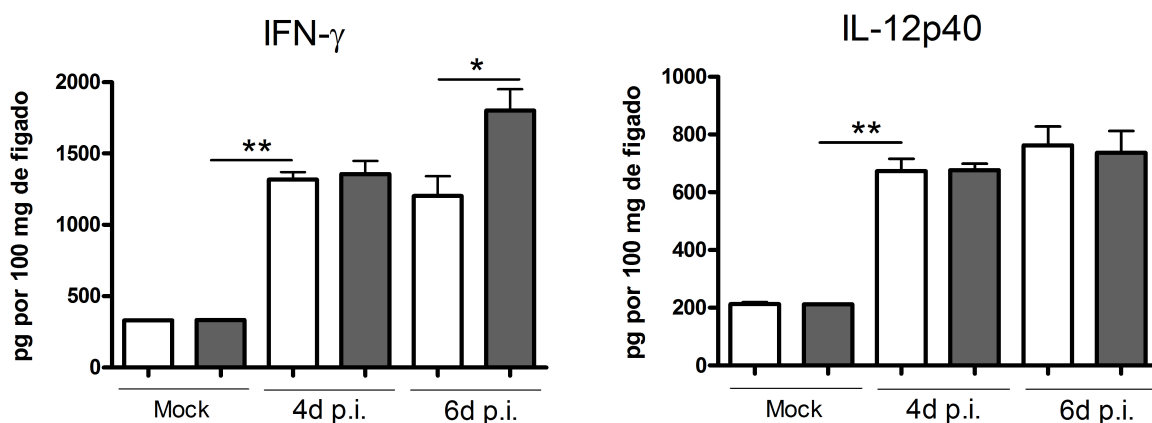
De forma similar, a quimiocina CXCL1/KC é produzida em grandes concentrações no baço de animais WT infectados. Análoga da IL-8 humana e importante quimiocina produzida durante a infecção pelo dengue (Juffrie *et al.*, 2000; Medin *et al.*, 2005), KC é associada ao recrutamento e acúmulo de neutrófilos para órgãos alvo, este último fenômeno já observado em nosso modelo experimental (**Objetivo 1**).

Em paralelo ao exposto, camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  apresentaram níveis significativamente reduzidos de todas as citocinas avaliadas entre os dias 4 e 6 p.i. (Figura 29). Além do mais, níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , apesar de apresentarem perfil de produção irregular, tendem a uma redução nestes animais, especialmente TNF- $\alpha$  nos dias associados à doença grave (Figura 30). Não foram observadas diferenças significativas para as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12p40 no fígado de animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  infectados, fator muitas vezes relacionado ao alto *background* encontrado durante a infecção, normalmente em função da acidez e metabolismo do órgão lesionado, mascarando diferenças sutis possivelmente encontradas somente em nível transcricional (Figura 31). Além do mais, não foram observadas diferenças entre os níveis basais das citocinas/quimiocinas avaliadas em animais não infectados WT e KO (dados não mostrados).

Em conjunto estes dados sustentam a relevância de células iNKT em mediar parte importante da exacerbação da resposta inflamatória associada a infecção via um *cytokine storm*.



**Figura 30. Produção de citocinas no baço após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$ .** Animais WT e KO foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados entre os dias 4 e 6 p.i para análise de amostras de tecido. Produção da citocina TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em homogenato de baço foi avaliada por ELISA. Os dados estão expressos em pg por 100 mg de tecido. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=4-8 animais). \* p < 0.05. **mock:** animais não infectados. **Branco:** WT. **Cinza:** KO.



**Figura 31. Produção de citocinas no fígado após infecção pelo DENV-2 em animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$ .** Animais WT e KO foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados entre os dias 4 e 6 p.i para análise de amostras de tecido. Produção da citocina IFN- $\gamma$  e IL-12p40 em homogenato de fígado foi avaliada por ELISA. Os dados estão expressos em pg por 100 mg de tecido. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=4-8 animais). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01. **mock:** animais não infectados. **Branco:** WT. **Cinza:** KO.

#### 4.10. Redução da ativação de células NK e neutrófilos durante a infecção pelo DENV-2 em camundongos $J\alpha 18^{-/-}$

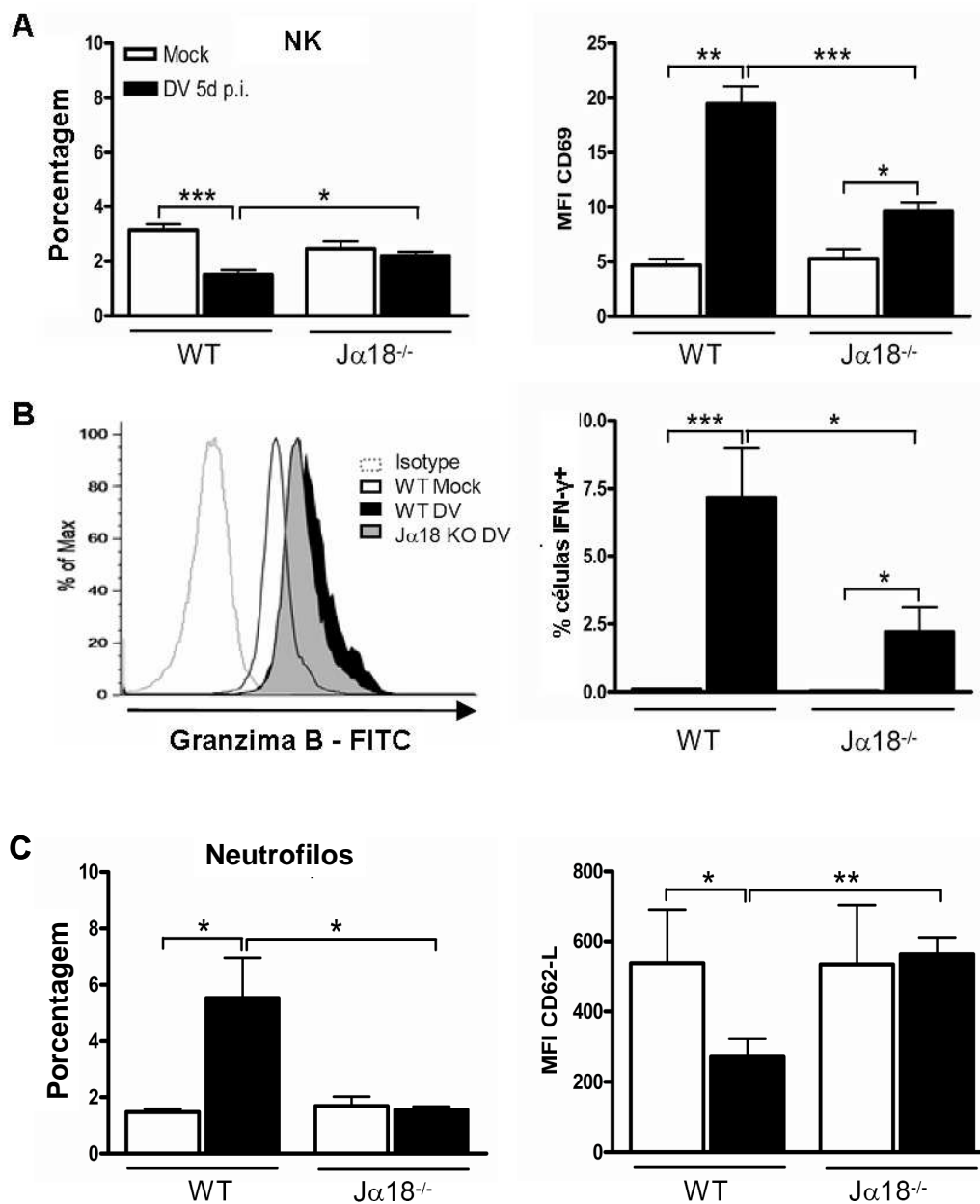
A ativação *in vivo* de células iNKT desencadeia uma estimulação seqüencial, e as vezes expansão, de varias células componentes da resposta imune, incluindo NK, neutrófilos e linfócitos T convencionais, importantes na resposta a infecção pelo dengue (Liu *et al.*, 2002; Van Dommelen e Degli-Esposti, 2004; Chau *et al.*, 2008). Desta forma confirmamos o impacto destas células durante a infecção experimental pelo DENV-2 no dia 5 p.i e conseqüente relação com a ausência de células iNKT.

Como visto na Figura 32, a infecção pelo DENV-2 foi associada com a redução na freqüência de células NK (Figura 32A) no baço de animais WT. De forma contraria, a freqüência desta população não foi significativamente alterada em animais  $J\alpha 18^{-/-}$  quando comparados a animais não infectados. No que diz respeito ao perfil de ativação durante a infecção, células NK de animais WT infectados apresentam maior expressão da molécula CD69 em comparação às células de animais  $J\alpha 18^{-/-}$ . Além do mais, a expressão de granzima B (Figura 32B) e CD107 $\alpha$  (dados não mostrados) em células NK de animais WT encontram-se significativamente aumentada em relação a animais  $J\alpha 18^{-/-}$ . As duas moléculas são reconhecidamente importantes na resposta celular citotóxica.

Células NK do baço de camundongos WT infectados positivamente marcadas para IFN- $\gamma$  estão significativamente aumentadas no dia 5 p.i., enquanto este fenômeno foi reduzido em camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  (Figura 32B).

A Figura 32C mostra que o acúmulo de neutrófilos no baço de animais WT foi significativamente aumentado em decorrência da infecção pelo DENV-2 5 dias p.i.. Animais  $J\alpha 18^{-/-}$  apresentam níveis similares ao de animais não infectados. Em termos de ativação, animais WT infectados expressam maior nível de ativação de ativação, como observado pelo marcador CD62L (L-selectina, onde níveis menores representam maior ativação ou células já transmigradas). Neutrófilos de animais  $J\alpha 18^{-/-}$  apresentam perfil de ativação de neutrófilos similar ao de animais não infectados, pelo menos termos de expressão de CD62L.





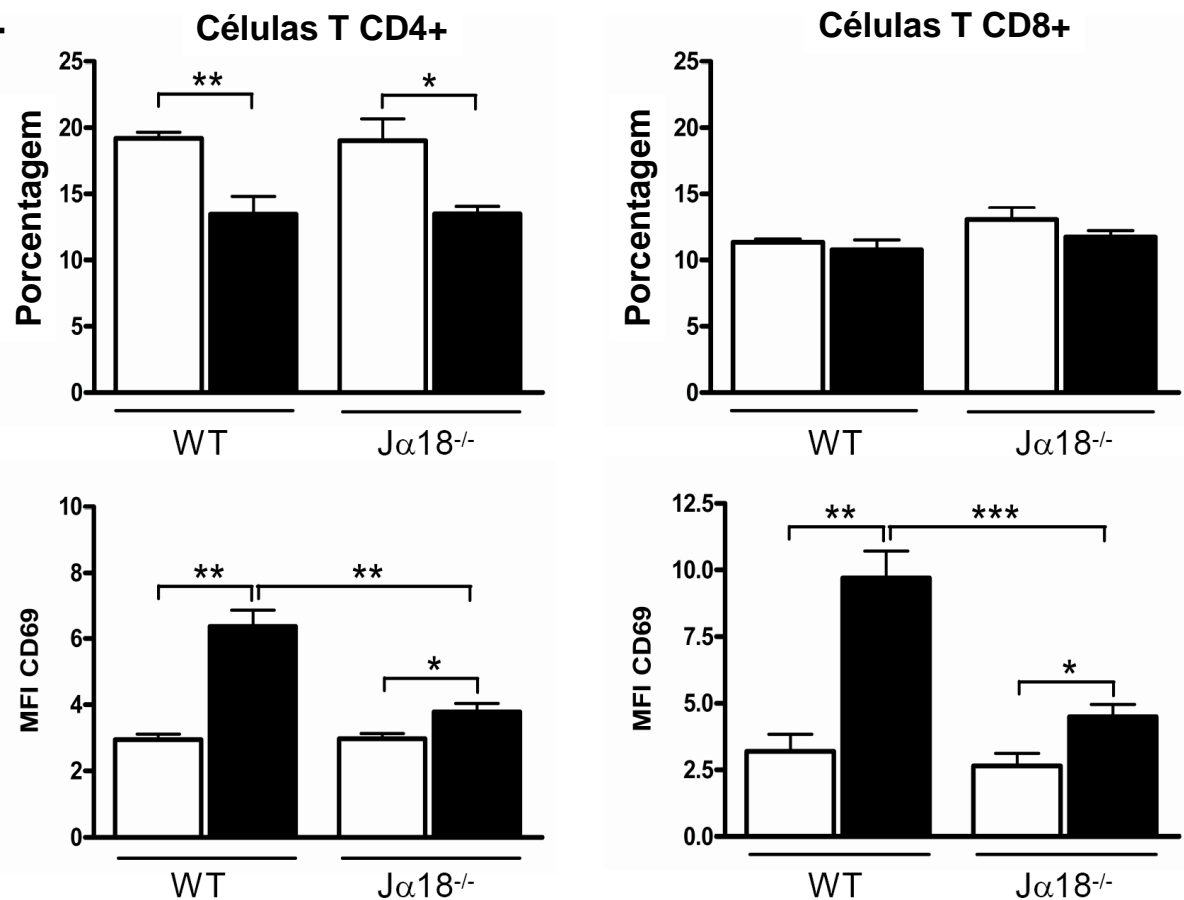
**Figura 32. Porcentagem e ativação de células NK durante a infecção pelo DENV-2 em animais WT e Jα18<sup>-/-</sup>.** Animais WT e KO foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados nos dia 5 p.i. Leucócitos esplênicos foram marcados com anticorpos específicos. Citometria de fluxo, de acordo com tamanho e granulosidade, foi tomada como análise. **Painel A:** Frequência de células NK (CD5<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) no baço de animais não infectados ou infectados com DENV-2 e expressão do marcador de superfície CD69. **Painel B:** Expressão de Granzima B e porcentagem de células positivas para IFN-γ nas células NK (CD5<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) marcadas no dia 5 p.i. **Painel C:** Frequência de neutrofilos (CD11c<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>) no baço de animais não infectados ou infectados com DENV-2 e expressão do marcador de superfície CD62L. Histogramas de barras representam a expressão do marcador em animais WT ou KO infectados pelo DENV-2 como expresso por MFI ou porcentagem. Resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=3-8 animais). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001. **mock:** animais não infectados. **MFI:** Intensidade de fluorescência média. **Branco:** mock. **Preto:** DENV-2.

A ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> tem sido comumente associada a severidade da infecção pelo dengue (Chau *et al.*, 2008), além de que em nosso modelo experimental esta associação foi também demonstrada no **Objetivo 1**.

Não observamos diferenças na porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> apesar de haver uma redução significativa na porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> após a infecção pelo DENV-2 no dia 5 p.i. (Figura 33). Não houve diferenças entre as porcentagens destas populações celulares para camundongos WT e J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>. Entretanto, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> apresentam elevada expressão de CD69 em camundongos WT infectados no dia 5 p.i. De forma importante, esta ativação é significativamente menos pronunciada em animais J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> (Figura 33).

Como nota, é importante ressaltar que algumas variações encontradas nas porcentagens ou no perfil de certas populações aqui estudadas podem diferir daquelas apresentadas no **Objetivo 1**, tanto pelo inóculo utilizado como pelo ponto escolhido para avaliação. Estas diferenças foram estratégias escolhidas em função das hipóteses avaliadas. De qualquer forma a mensagem segue o mesmo sentido no que diz respeito à relevância destes tipos celulares nos dois estudos componentes da presente tese.

Os dados aqui apresentados mostram uma menor ativação geral de células da imunidade inata (NK e neutrófilos) e também de células da resposta adaptativa na ausência de células iNKT durante a infecção experimental pelo DENV-2. Apresentamos aqui um importante papel cooperativo entre estas populações celulares durante a infecção experimental.



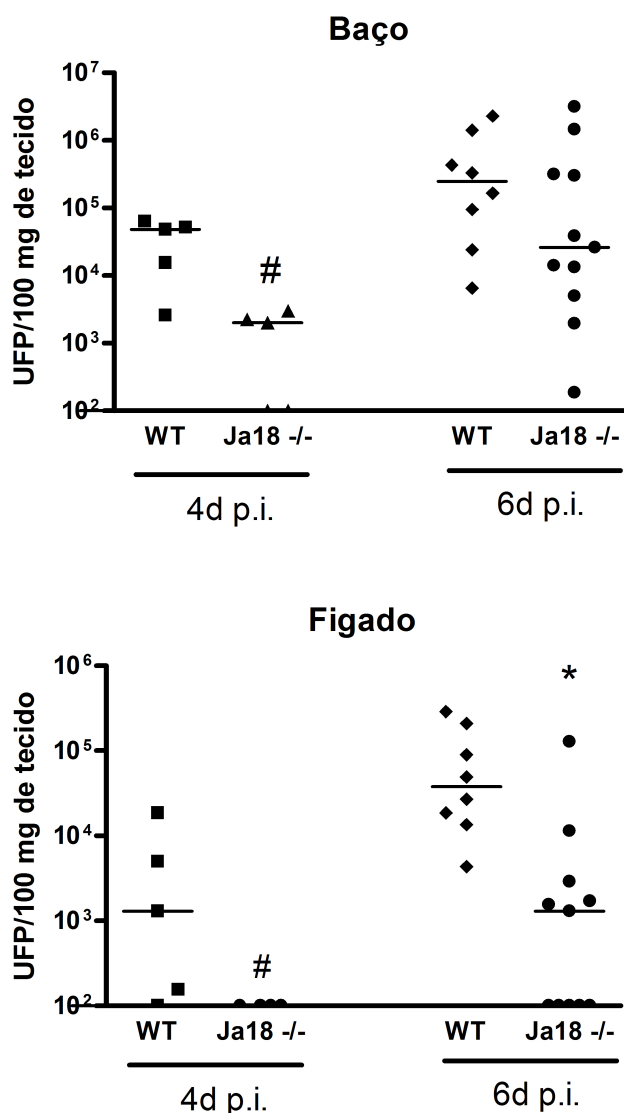
**Figura 33. Porcentagem e ativação de linfócitos T durante a infecção pelo DENV-2 em animais WT e Jα18<sup>-/-</sup>.** Animais WT e KO foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 5 p.i. Leucócitos esplênicos foram marcados com anticorpos específicos. Citometria de fluxo, de acordo com tamanho e granulosidade, foi tomada como análise. Porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) e T CD8<sup>+</sup> no baço de animais não infectados ou infectados com DENV-2 e expressão do marcador de superfície CD69. Histogramas de barras representam a expressão do marcador em animais WT ou KO infectados pelo DENV-2 como expresso por MFI. Resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=3-8 animais). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001. **mock**: animais não infectados. **MFI**: Intensidade de fluorescência média. **Branco**: mock. **Preto**: DENV-2.

#### 4.11. Relação entre células iNKT e carga viral em camundongos infectados pelo DENV-2

Como discutido até o momento, camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  apresentam doença branda, além menor resposta inflamatória sistêmica e dano tecidual após infecção experimental pelo DENV-2. Perguntamo-nos então se células iNKT contribuiriam para a resposta do hospedeiro contra o vírus a infecção, como avaliado pela carga viral em órgãos alvo.

Como evidenciado na Figura 34, foram observados títulos virais significativos no baço e fígado de camundongos WT no dia 6 p.i. No dia 4 p.i. já é possível detectar títulos virais nestes mesmos órgãos. Entretanto, a carga viral no fígado de camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  infectados é significativamente menor do que a observada em camundongos, tanto no dia 4 como no dia 6, representando em média  $8.4 \times 10^2$  UFP/100 mg de tecido quando comparada a de camundongos WT ( $4.1 \times 10^4$  UFP/100 mg de tecido) no momento mais tardio da doença. Embora não significativa no dia 6, a carga viral apresenta tendência a redução no baço de camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  em comparação a animais WT ( $3.6 \times 10^4$  contra  $1.8 \times 10^5$  UFP/100 mg de , respectivamente), pelo menos no tempo escolhido. No dia 4 p.i, entretanto, camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  apresentam menor carga viral quando comparados a animais WT ( $P=0.0139$ ).

Assim, em nosso modelo experimental, a deficiência em células iNKT não resulta em disfunção do *clearance* viral durante a infecção, mas, ao contrario, leva a uma redução da carga viral em órgãos alvo da doença, como o fígado. Isto parece estar associado a eventos iniciais, uma vez que no dia 4 p.i. o *clearance* em animais  $J\alpha 18^{-/-}$  se mostra eficiente. Isto sugere que, neste modelo de infecção, células iNKT não somente favorecem a resposta inflamatória sistêmica como também a replicação viral. Fenômeno este que pode ser associado direta ou indiretamente com a exacerbação da resposta inflamatória, o que culminaria em uma resposta deficiente do hospedeiro ou falência, ao contrario do que se preconiza freqüentemente em doenças inflamatórias de origem infecciosa. Considerando que animais  $J\alpha 18^{-/-}$  não sucumbem a doença como animais WT, mecanismos moleculares e celulares que medeiam a relação das células iNKT com o *clearance* viral, principalmente em momentos anteriores ao choque hemorrágico, merecem estudos mais aprofundados.

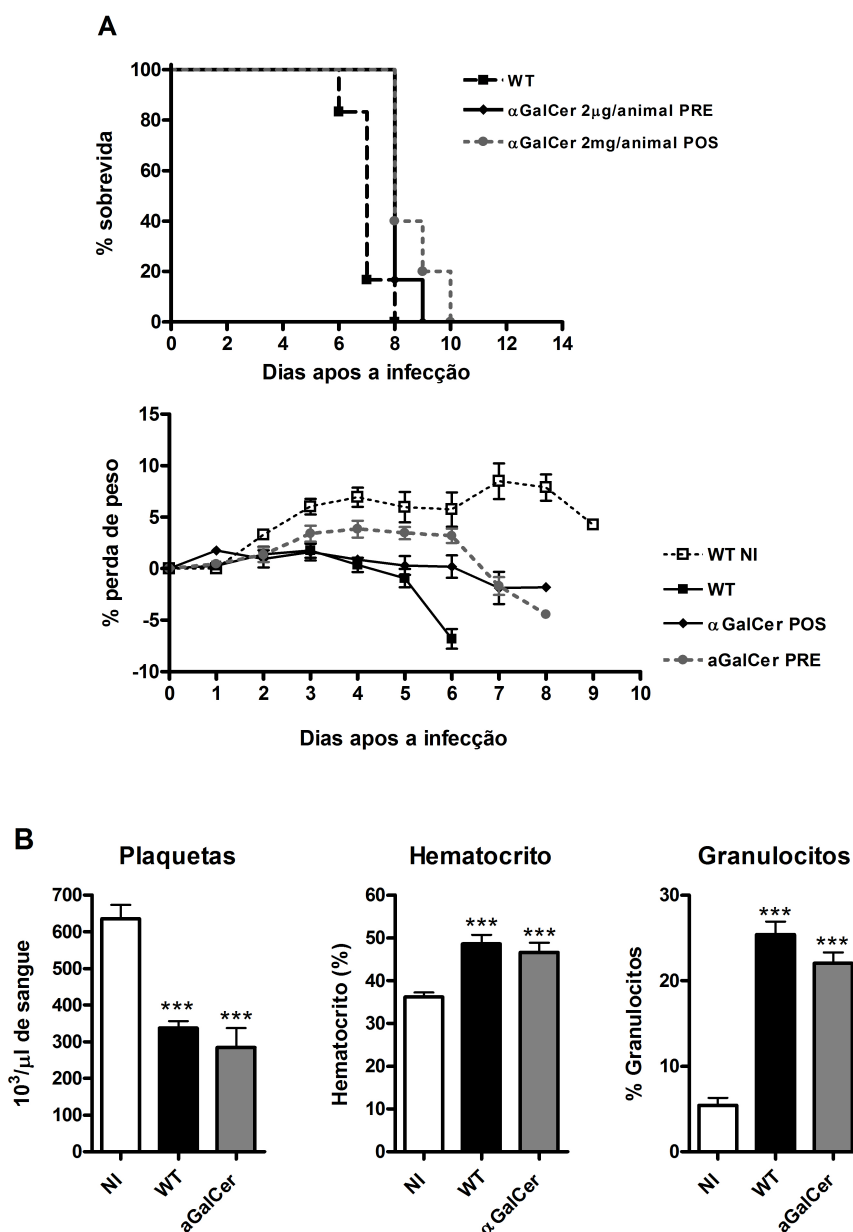


**Figura 34. Carga viral no baço e fígado de camundongos WT e Ja18<sup>-/-</sup> após infecção pelo DENV-2.** Animais WT e KO foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados nos dias 4 e 6 p.i para processamento das amostras de tecido e obtenção dos títulos virais em células LLC-MK2. Os dados estão expressos em log de UFP (unidades formadoras de placas) por 100 mg de tecido. Resultados foram expressos como a média geométrica e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-10 animais). **Baço:** # P=0.0139. **Fígado:** #P=0,0159, \*P=0,0026.

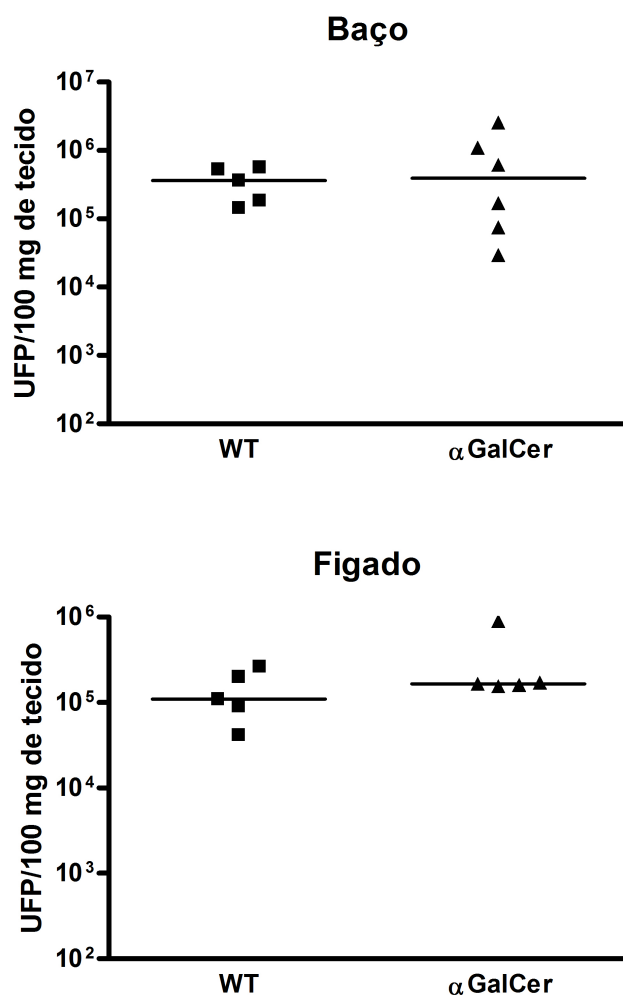
#### 4.12. Efeitos do tratamento com $\alpha$ GAL-CER sobre a mortalidade e parâmetros hematológicos durante a infecção com DENV-2

Após demonstrarmos que a ausência de células iNKT leva a uma redução da resposta inflamatória associada a infecção pelo DENV-2 e conseqüentemente menor mortalidade e carga viral, resolvemos investigar o efeito da ativação destas células *in vivo*. Para tanto, grupos de animais WT foram tratados com o glicolípide  $\alpha$ GAL-CER 1 dia antes da infecção (pré-tratamento) ou 2 dias depois da infecção (pós-tratamento) em dose única. Apesar de estatisticamente significativas ( $P < 0.05$ ), tanto o pré como o pós tratamento com  $\alpha$ GAL-CER (2  $\mu$ g/animal) levaram a pequenas diferenças na letalidade e perda de peso, de aproximadamente 1 dia a mais de sobrevivência e menor perda de peso associada a infecção experimental em camundongos WT (Figura 35A). Na abordagem de pós-tratamento/terapêutica, o atraso observado para a mortalidade não refletiu em redução das alterações hematológicas associadas à doença no dia 6 p.i., avaliado pela contagem de plaquetas e porcentagem de hematócrito e granulócitos (Figura 35B). O tratamento com  $\alpha$ GAL-CER em animais WT não infectados não leva a perda de peso ou alterações hematológicas (dados não mostrados).

No que diz respeito à carga viral, não foram observadas diferenças quanto aos títulos encontrados no fígado e baço de animais WT e  $J\alpha 18^{-/-}$  nos dias 4 p.i. (dados não mostrados) e no dia 6 p.i. (Figura 36). Apesar de intrigantes, estes dados sugerem que a ativação artificial de células iNKT durante a infecção não interfere na progressão da doença, onde se esperaria uma possível exacerbação baseados nos resultados apresentados até o momento. Tais fatos reforçam a idéia de que a ativação natural de células iNKT é multifatorial e progressiva, dependendo de componentes que parecem não ser disponibilizados somente com a ativação via  $\alpha$ GAL-CER/CD1d, como a produção diferencial de citocinas e a necessidade de a presença e/ou ativação de certas populações celulares.



**Figura 35. Mortalidade, perda de peso e hematologia em camundongos WT tratados com αGal-Cer e infectados com DENV-2. Painel A:** Camundongos WT ou WT+αGal-Cer (2 µg/animal), passando por pré (1 hora antes da infecção) ou pós-tratamento (2 dias p.i.), do mesmo sexo e idade, foram infectados com 30DL<sub>50</sub> DENV-2 e monitorados diariamente para avaliação da mortalidade e perda de peso. **Painel A:** No alto, porcentagem de sobrevivida de camundongos WT ou tratados com αGal-Cer. Embaixo, perda de peso expressa como a porcentagem de peso em comparação ao peso inicial do animal. Resultados para a perda de peso foram expressos como média ± EPM. Todos os dados são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=10-15 animais). **Painel B:** Análise hematológica foi feita no dias 6 p.i. em animais WT infectados com 30DL<sub>50</sub> DENV-2 e pós-tratados com 2µg de αGal-Cer (2 dias p.i.) para se avaliar alterações na contagem de plaquetas e porcentagem de hematócrito e granulócitos no sangue de animais infectados WT e tratados. Resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais). \*\*\* P < 0.001. NI: animais não infectados.



**Figura 36. Carga viral no baço e fígado de camundongos WT tratados com  $\alpha$ Gal-Cer e infectados com DENV-2.** Camundongos WT ou WT+ $\alpha$ Gal-Cer (2 $\mu$ g/animal) passando por pós-tratamento (2 dias p.i.) foram infectados com 30DL<sub>50</sub> de DENV-2 e então sacrificados no dia 6 p.i para processamento das amostras de tecido e obtenção dos títulos virais em células LLC-MK2. Os dados estão expressos em log de UFP (unidades formadoras de placas) por 100 mg de tecido. Resultados foram expressos como a média geométrica e são representativos de pelo menos 2 experimentos (n=5-6 animais).



## **V. DISCUSSÃO**

## 5. Discussão

No presente trabalho investigamos o papel desempenhado pelos receptores para quimiocinas da família CC, especificamente CCR1, CCR2 e CCR4, no contexto da infecção experimental pelo *Dengue vírus*, sugerindo que estes receptores desempenham papéis distintos na resposta inflamatória associada à infecção (i.e. maior relação com a resposta inflamatória sistêmica e/ou com a resposta inflamatória associada ao dano hepático). Além do mais, investigamos em paralelo o papel de células iNKT neste mesmo modelo experimental, sugerindo que estas células desempenham papel fundamental na progressão da doença, especialmente por estarem associadas a produção maciça de mediadores inflamatórios, provavelmente contribuindo para o dano tecidual e levando a falência do hospedeiro. Além do mais, apesar de não demonstrado experimentalmente, receptores como CCR2 e CCR4 podem estar envolvidos neste fenômeno, contribuindo para o menor recrutamento e ativação de células iNKT neste modelo. O presente trabalho abre portas para duas frentes de intervenção terapêutica a serem desenvolvidas: inibição de receptores de quimiocinas e antagonismo/inibição de células iNKT.

Mais do que isso, esta tese aporta informações até então pouco discutidas em termos práticos, devido essencialmente a ausência de modelos experimentais viáveis, como o envolvimento de quimiocinas, import antes marcadores da resposta inflamatória em doenças infecciosas, e sua associação com mortalidade e dano tecidual, assim como células da resposta imune e sua relação com a produção de mediadores e conseqüente contribuição para dano tecidual. O advento de um modelo murino imunocompetente serviu como base para a fundamentação deste estudo e tende a ser a melhor ferramenta para esclarecer minuciosamente os diversos aspectos celulares e moleculares envolvidos na resposta ao vírus da dengue em vertebrados.

No que diz respeito aos receptores para quimiocinas CC avaliados, nosso maiores achados podem ser resumidos da seguinte maneira: 1) O receptor CCR1 parece não possuir um papel fundamental na patogênese de da infecção experimental grave em camundongos; 2) o receptor CCR2 parece contribuir para a lesão hepática associada à infecção pelo dengue, o que se refletiu em menor ativação leucocitária e menor mortalidade em camundongos CCR2<sup>-/-</sup>. Entretanto não observamos diferenças apreciáveis na resposta inflamatória sistêmica associada à infecção (i.e.

citocinas/quimiocinas no baço) e 3) o receptor CCR4 também contribui para a patogênese da infecção experimental pelo dengue e é relevante para o dano hepático associado a infecção assim como para a resposta inflamatória sistêmica. Menor ativação leucocitária global e menor mortalidade foram marcantes em animais CCR4<sup>-/-</sup>.

Além do importante papel desempenhado por quimiocinas em doenças infecciosas e o interesse emergente em se compreender e encontrar alvos moleculares e celulares que possam servir como pontos de intervenção terapêutica na infecção pelo dengue, o desenvolvimento de um modelo experimental que reflita a FHD/SCD se faz necessário e permite maiores abordagens experimentais sobre o assunto.

Os pontos avaliados para o estudo da infecção experimental pelo dengue vírus, em geral entre os dias 4 e 6 p.i., estão de acordo com a dinâmica da infecção encontrada em humanos, coincidindo com o momento em que estes procuram por ajuda médica, seja na FD ou na FHD (Gibbons e Vaughn, 2002; Green e Rothman, 2006; Martina *et al.*, 2009). Além do mais, o conhecimento prévio dos mecanismos envolvidos em síndromes com choque associado, como SIRS e sepse, podem contribuir para a elucidação e desenvolvimento de estratégias experimentais para o controle da resposta inflamatória exacerbada, o que gera os maiores problemas de saúde pública relacionados a infecção pelo dengue. Antes de tudo estamos lidando com uma resposta inflamatória sistêmica multifatorial e com mecanismos de desencadeamento e resolução praticamente desconhecidos.

O receptor CCR1 é amplamente expresso em populações tanto monocíticas e como não-monocíticas (Murphy, 1994; Baggiolini, 1998; Locati *et al.*, 2002). Ligantes para CCR1, como CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL4/MIP-1 $\beta$ , são encontrados em grandes concentrações no plasma de pacientes infectados pelo DENV, podendo haver associação com a severidade da doença (Spain-Santana *et al.*, 2001; Bozza *et al.*, 2008; Sierra *et al.*). Consistente com estes achados, níveis de CCL3/MIP-1 $\alpha$  estavam aumentados no baço e fígado de animais WT infectados pelo DENV-2. Entretanto, observamos que o curso da infecção em animais CCR1<sup>-/-</sup> foi bastante similar ao observado em camundongos WT, sem diferenças na letalidade ou perda de peso. De forma interessante, a produção de CCL3/MIP-1 $\alpha$  estava aumentada no baço e fígado de animais CCR1<sup>-/-</sup> infectados. Isto vai de acordo com a idéia de que receptores para quimiocinas funcionam como importantes moduladores da

concentração de quimiocinas em tecidos inflamados, onde são capazes de seqüestrar seus ligantes (ditos “ scavengers”) e assim reduzir esta concentração (Cardona *et al.*, 2008).

Uma vez que populações que expressam o receptor CCR1, como linfócitos e células NKT, não apresentam frequência e ativação diferentes das observadas em animais WT após a infecção, o papel de células da imunidade inata, como NK e neutrófilos, deve ser levado em consideração. Neste sentido, macrófagos parecem desempenhar também um papel importante, uma vez que o acúmulo/ativação desta população no baço de animais CCR1<sup>-/-</sup> esta aumentada em comparação a animais WT, o que pode contribuir de forma importante para a produção de citocinas e quimiocinas em sinergismo com neutrófilos, também aumentados neste órgão. Os níveis de CCL2/JE estão significativamente aumentados no baço de animais CCR1<sup>-/-</sup>, o que corrobora esta hipótese.

Embora os níveis de CCL3 estejam aumentados no pico de gravidade deste modelo experimental, este achado não se relaciona diretamente com maior letalidade, carga viral e acúmulo linfocítico em órgãos alvo através do receptor CCR1. De forma complementar, a quimiocina CCL3 pode estar envolvida indiretamente no recrutamento de neutrófilos, mecanismo já descrito em modelos de sepsis e que é dependente de uma cascata de fatores quimiotáticos (Ramos *et al.*, 2006). Já foi demonstrado também que CCL3/MIP-1  $\alpha$  pode, através dos receptores CCR5 e CCR3, podem contribuir para o recrutamento e ativação de neutrófilos em lesões isquêmicas e na inflamação sistêmica decorrente da infecção pelo HIV (Jan *et al.*, 2006; Reichel *et al.*, 2006). Níveis elevados de CCL3 podem também ativar outro receptor importante para esta quimiocina: CCR5. Especialmente na infecção por outro flavivirus, a febre do oeste do Nilo (WNV), este receptor possui um papel fundamental na patogênese da doença (Lim *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2010). Não investigamos aqui o papel do receptor CCR 5 no presente modelo experimental (Guabiraba *et al.*, em preparação) mas sugerimos aqui que o camundongo CCR1<sup>-/-</sup> não apresenta fenótipo diferente quando comparado a animais WT infectados com um inóculo que causa doença similar a FHD/SCD em camundongos. CCR1 parece desempenhar um papel discreto e não fundamental na progressão e severidade da infecção pelo DENV. Este receptor, entretanto, parece ter função consideravelmente complexa na resposta inflamatória, devido à sua

variedade de ligantes e distribuição ubíqua entre populações celulares em diferentes estágios da resposta.

A quimiocina CCL2/MCP-1 é produzida em diversas condições inflamatórias e exerce suas funções através do receptor CCR2, expresso em monócitos, macrófagos, algumas linhagens linfocíticas e também neutrófilos. (Johnston *et al.*, 1999; Zlotnik e Yoshie, 2000; Locati *et al.*, 2002; Speyer *et al.*, 2004). Níveis de CCL2 já estão associados com o mau prognóstico em pacientes infectados pelo DENV (Lee *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2008). No presente trabalho, a taxa de mortalidade foi significativamente reduzida em animais CCR2<sup>-/-</sup> infectados pelo DENV-2 e isto parece estar diretamente associado com uma menor concentração de transaminases hepáticas assim como com a menor inflamação e lesão hepáticas. Importante frisar que hepatócitos são alvos comuns do DENV e podem responder ativamente através da produção de citocinas e quimiocinas, contribuindo para a lesão local e conseqüente déficit de função hepática (Suksanpaisan *et al.*, 2007). A trombocitopenia e a hemoconcentração observadas em animais CCR2<sup>-/-</sup> foi similar a observada em animais WT infectados, embora os níveis de IL-6 e IFN- $\gamma$ , mas não TNF- $\alpha$ , estarem reduzidos sistemicamente nos animais CCR2<sup>-/-</sup>. Estas alterações hematológicas parecem ser secundárias ao pico de produção de citocinas pro-inflamatórias. Níveis de CCL2 estão elevados tanto no baço como fígado destes animais, corroborando a hipótese do controle fisiológico de quimiocinas. CCL3/MIP-1 $\alpha$  e CCL5/RANTES também aparecem em concentrações elevadas quando comparadas a animais WT no dia 6 p.i., mesmo que o fenômeno não parece contribuir para a maior ativação ou recrutamento leucocitário em animais CCR2<sup>-/-</sup>. Observamos uma importante redução na ativação de populações celulares envolvidas na infecção pelo DENV-2, notadamente células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NKT e macrófagos. Os achados envolvendo células NKT/iNKT vão de encontro com os apresentados na presente tese (**Objetivo 2**), sugerindo um importante papel para estas populações na resposta inflamatória (*cytokine storm*) associada ao DENV. Alguns estudos demonstram que estas células respondem a CCL2/MCP-1 em doenças infecciosas (Kawakami *et al.*, 2001), assim como podem ser recrutadas para sítios inflamatórios através do receptor CCR2 (Kim *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003). Além do mais, a menor ativação leucocitária, por si só, já pode ser um indicativo da menor produção sistêmica de citocinas e a menor lesão hepática nestes animais.

Embora haja um acúmulo significativo de neutrófilos no baço e fígado de animais CCR2<sup>-/-</sup>, isto não parece contribuir para o mau prognóstico da doença, incluindo mortalidade. A menor concentração de IL-6 observada no fígado de animais CCR2<sup>-/-</sup> infectados, pode, por exemplo, contribuir para menor ativação e degranulação de neutrófilos. Além do mais, esta ativação de neutrófilos dependente de IL-6 e quimiocinas CC já foi demonstrada na seps e experimental (Speyer *et al.*, 2004). Estas diferenças no recrutamento e ativação de leucócitos não resultaram em alterações na carga viral no fígado, sugerindo que animais CCR2<sup>-/-</sup> devem recuperar precocemente o *status* hemodinâmico, que estaria associado a uma menor lesão tecidual, colaborando assim para um clearance efetivo após o pico da doença.

Um maior extravasamento plasmático decorrente da resposta inflamatória associada à infecção pelo DENV pode levar a hemoconcentração, hipotensão e morte (Green e Rothman, 2006; Lee *et al.*, 2006; Srikiatkachorn *et al.*, 2007; Binh *et al.*, 2009; Srikiatkachorn, 2009). Entretanto, não está muito claro o porquê da hemoconcentração observada em animais CCR2<sup>-/-</sup> no dia 6 p.i., uma vez que os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias estão significativamente reduzidos, assim como a lesão hepática e consequente mortalidade associada. É possível que alguns animais podem eventualmente se recuperar da permeabilidade vascular grave observada na infecção, o que levaria a hemoconcentração e não necessariamente a mortalidade uma vez que eles ainda possuiriam função hepática adequada. Uma abordagem experimental para explicar este fenômeno se torna difícil uma vez que a maioria dos animais WT está morta neste estágio da doença para fins de comparação ao controle. Animais CCR2<sup>-/-</sup> que resistem à infecção possuem parâmetros hematológicos inalterados em estágios tardios (dia 14), sugerindo uma recuperação em detrimento do pico de permeabilidade vascular observado na fase crítica da doença (dados não mostrados).

Desta forma, o receptor para quimiocinas CCR2 desempenha papel importante na patogênese da infecção experimental pelo DENV-2. A maior sobrevivência observada em animais CCR2<sup>-/-</sup> é provavelmente secundária ao menor dano hepático, menor ativação celular e menor produção de citocinas/quimiocinas.

O receptor CCR4 é expresso em células T, especialmente linfócitos do tipo Th2, e participa de diversas condições patológicas como, por exemplo, asma, câncer e doença inflamatória intestinal (Vijayanand *et al.*; Luster, 2001; Nouri-Aria *et al.*, 2002; Schuh *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2007; Di Stasi *et al.*, 2009). De forma

interessante, a deficiência no receptor CCR4 resulta na diminuição da resposta inflamatória induzida pela sepse polimicrobiana em camundongos e no choque endotóxico induzido por LPS, implicando este receptor na patogênese de condições inflamatórias agudas (Chvatchko *et al.*, 2000; Traeger *et al.*, 2008). Outros experimentos, entretanto, demonstraram um papel protetor para a quimiocina CCL22/MDC, um dos ligantes para CCR4, em um modelo de sepse (CLP) em camundongos (Matsukawa *et al.*, 2000).

Em experimentos preliminares observamos que a quimiocina CCL17/TARC, um dos ligantes para CCR4, era produzida em níveis relativamente altos no baço de camundongos infectados pelo DENV-2. Até o presente momento não existem outros relatos mostrando a produção desta quimiocina em uma infecção por flavivirus. Experimentos com camundongos CCR4<sup>-/-</sup> revelaram que estes animais estão protegidos da mortalidade e perda de peso associadas a infecção experimental pelo DENV-2. Complementar a este achado, estes animais não apresentam hemoconcentração apreciável e considerável redução na trombocitopenia, granulocitose, dano hepático, resposta inflamatória sistêmica e ativação de leucócitos após a infecção experimental, incluindo reduzido acúmulo de neutrófilos no baço e fígado. Toda esta forte regulação negativa da resposta inflamatória associada ao DENV se reflete em maior sobrevivência para animais CCR4<sup>-/-</sup>. Importante frisar que apesar do fenótipo de proteção observado em animais CCR4<sup>-/-</sup>, não houve diferença na carga viral quando comparada a de animais WT. Isto sugere que o receptor CCR4 não parece estar envolvido com controle da replicação viral ou mesmo da entrada do vírus, e sim participaria na cascata de eventos que levam ao dano tecidual e a resposta inflamatória sistêmica deletéria associada ao DENV. Neste quesito, nossos resultados vão de acordo com o papel deletério do receptor CCR4 na patogênese da sepse bacteriana (Chvatchko *et al.*, 2000; Traeger *et al.*, 2008).

É difícil sugerir um mecanismo pelo qual o CCR4 contribuiria para a patogênese da infecção pelo dengue. Entretanto, CCR4 pode ser importante para o tráfego e ativação de células NKT e linfócitos T CD8<sup>+</sup> por pelo menos duas vias de quimiocinas independentes, incluindo CCL17/TARC e CCL22/MDC (Kim *et al.*, 2002; Semmling *et al.*). Considerando o importante papel atribuído a células NKT/iNKT na patogênese do presente modelo experimental, é possível que CCR4, assim como CCR2, estejam envolvidos no recrutamento e ativação destes tipos celulares,

contribuindo assim para lesão e mortalidade. Desta forma, considerando doenças/patologias com choque associado, no caso viral (presente estudo) e bacteriano (sepse), o bloqueio do receptor CCR4 pode ser benéfico em termos terapêuticos, um conceito que ainda deve ser melhor elucidado em modelos animais e então testado em humanos. Até o momento não conheço estudos sugerindo intervenções terapêuticas ou o antagonismo funcional do receptor CCR4 em doenças virais envolvendo choque hemorrágico, o que torna esta abordagem inédita e de relevância no campo da imunopatologia de doenças infecciosas.

Em termos gerais, demonstramos nesta primeira seção que os receptores para quimiocinas da família CC, especificamente CCR1, CCR2 e CCR4 desempenham papéis diferentes na patogênese da infecção experimental pelo DENV. Em contraste, estes receptores parecem não desempenhar um papel essencial na proteção contra a infecção primária pelo vírus da dengue. Nossos estudos sugerem que a produção exacerbada de quimiocinas (ou *chemokine storm*) que se segue após desencadeada a infecção está associada principalmente ao desenvolvimento da doença do que proteção. É possível, desta forma, inferir que antagonistas para receptores de quimiocinas, notadamente CCR2 e CCR4, além de ligantes solúveis para quimiocinas envolvidas nestas respostas, podem servir como co-adjuvantes na terapia para as manifestações severas da infecção pelo dengue.

Tendo em vista o importante efeito que a deleção dos receptores CCR2 e CCR4 exercem sobre o recrutamento e ativação de populações linfocíticas, especialmente NKT, contribuindo para uma menor gravidade e maior sobrevivência associada à doença, nossos resultados apontam para um quadro onde quimiocinas produzidas durante a infecção pela dengue parecem contribuir para o acúmulo e função de células NKT/iNKT no presente modelo, o que discutiremos em seguida. Não podemos ainda inferir se CCR2 e CCR4 seriam os receptores diretamente envolvidos no acúmulo de células iNKT, mas nossas evidências sugerem que o caminho a ser discutido na fisiopatologia do dengue deve passar pelas interações quimiocinas/receptores *versus* populações celulares participantes da resposta.

Até o presente momento, os mecanismos responsáveis em desencadear a doença e a resposta do hospedeiro são pouco definidos e a natureza da resposta imune protetora *versus* a resposta deletéria na infecção pelo dengue ainda é pouco conclusiva. Em particular, é importante definir o quanto a produção exacerbada de citocinas (*cytokine storm*) e o choque relacionado aos quadros graves da doença



são induzidos e eventualmente controlados. Considerando o papel de células iNKT na resposta do hospedeiro durante infecções virais e o controle e/ou estimulação da resposta inflamatória em vários sistemas, nos perguntamos o quanto estas células seriam importantes para a resposta do hospedeiro durante a infecção pelo DENV. Mostramos desta forma que células iNKT possuem um papel deletério durante a infecção pelo vírus, estando relacionadas de forma importante com a mortalidade e fisiopatologia características do modelo em questão.

As células NKT invariáveis desempenham diferentes papéis em infecções virais, onde no geral trazem algum benefício para o hospedeiro (Van Dommelen e Degli-Esposti, 2004; Barral e Brenner, 2007; Bendelac *et al.*, 2007). Nenhum estudo envolvendo infecções pelos vírus da família *Flaviviridae*, que incluem o DENV, WNV e o vírus da febre amarela, demonstram algum papel para células iNKT na fisiopatologia associada. Existe, entretanto, um relato sugerindo a participação de células iNKT na infecção pelo HCV (Inoue *et al.*, 2006), que apesar de pouco conclusivo sugere um importante papel para estas células na produção de IL-13 durante a infecção. Além do mais, é importante ressaltar que a infecção por alguns destes vírus, notadamente o da febre amarela e o WNV, incluem sintomatologia e aspectos clínicos similares ao DENV, o que incluem febre hemorrágica, resposta inflamatória sistêmica exacerbada e em alguns casos encefalite (Gubler, 1998; Gould e Solomon, 2008; Maximova *et al.*, 2009; Suthar *et al.*, 2009).

Embora a compreensão acerca de mecanismos celulares envolvidos nestas doenças esteja em pleno crescimento (Diamond, 2009; Sampath e Padmanabhan, 2009), incluindo o envolvimento de diferentes populações linfocíticas, a participação de células iNKT e vNKT em infecções por flavivirus é, em geral, desconhecida.

Infecções virais podem levar a ativação de células iNKT e no geral este mecanismo é importante para o controle da resposta imune local e sistêmica. Em um primeiro momento avaliamos a ativação e o perfil de células iNKT na infecção experimental pelo DENV-2, assim como o seu possível recrutamento/acúmulo e expansão no baço e fígado de animais infectados. Utilizando um inóculo capaz de induzir mortalidade significativa em animais WT, nossos dados mostram uma expansão massiva de células iNKT no baço e fígado, vista em termos de recrutamento e ativação durante as fases iniciais da infecção.

De forma contrária, a frequência e número de células iNKT diminuí no 5º dia após a infecção, um fenômeno provavelmente relacionado a internalização do TCR

que se segue a ativação destas células. Esta linfopenia, comentada na seção de resultados, pode estar também associada ao tráfico de leucócitos no baço, especialmente linfócitos, que estariam sendo recrutados para órgãos alvos, como o fígado. Além do mais, este fenômeno observado para leucócitos esplênicos reflete bastante a resposta sistêmica. Dados de nosso grupo mostram um aumento de linfócitos CD4 e CD8, além de células NKT, no fígado de animais infectados a partir do dia 4 p.i. (Guabiraba *et al.* 2010 em preparação), confirmando esta hipótese.

No que diz respeito ao status destas células no dia 5 após a infecção, observamos que a expressão da molécula marcadora de ativação CD69 está bastante aumentada em células iNKT. Também neste contexto, as células iNKT (assim como as células NK), tem a produção de IFN- $\gamma$  intracelular aumentada sem re-estimulação (i.e. PMA/ionomicina). Em conjunto, demonstramos pela primeira vez que células iNKT são ativadas durante a infecção experimental pelo DENV-2, além serem capazes de produzir IFN- $\gamma$ , fenômeno já relatado na literatura para células T CD4, CD8 e NK em humanos ou modelos experimentais de infecção pelo DENV (Mangada *et al.*, 2004; Shresta, Kyle, Robert Beatty, *et al.*, 2004).

Os mecanismos pelos quais estas células se tornam ativadas durante a infecção, seja através de CD1d e/ou de co-fatores, como as citocinas IL-12, IL-18 ou IFN- $\gamma$ , já demonstrados em outros modelos experimentais ( Exley *et al.*, 2003; Van Kaer e Joyce, 2005; Halder *et al.*, 2007; Tyznik *et al.*, 2008), estão atualmente sendo estudados. No que diz respeito à molécula CD1d, envolvida no mecanismo de ativação classificado como “direto”, demonstramos que camundongos CD1d<sup>-/-</sup> infectados apresentam letalidade similar a camundongos WT em nosso modelo. Apesar do mecanismo de ativação de células iNKT não estar completamente elucidado na infecção pelo DENV, sugerimos que no presente estudo a ativação e função efetora de células iNKT é independente de CD1d. De fato, após processamento pelas APCs, antígenos virais não possuem estruturas lipídicas, excluindo assim a apresentação clássica via CD1d. Estes dados realçam o conceito de que APCs (i.e. células dendríticas) produtoras de citocinas como IL-12 e IFN- $\gamma$ , em momentos ainda iniciais da infecção, parecem ser fundamentais para este processo. Além do mais, células vNKT parecem desempenhar um papel diferente das iNKT em nosso modelo, provavelmente contrabalanceando a resposta mediada por iNKT. Estudos mais aprofundados podem trazer informações mais precisas sobre o balanço iNKT/vNKT na infecção pelo DENV.

A inflamação sistêmica exacerbada observada na infecção aguda pelo DENV-2 em camundongos é um dos eventos essenciais que levam a mortalidade associada à infecção. A trombocitopenia e extravasamento vascular associados ao choque e a febre hemorrágica são pontos críticos na doença humana e nos modelos experimentais. Além do mais, no presente modelo, é possível observar apreciável dano tecidual, principalmente no parênquima hepático, associado à produção de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias e replicação viral não controlada no baço, fígado e sangue (Souza *et al.*, 2009; Assuncao-Miranda *et al.*, 2010).

Em termos fisiológicos, as células iNKT podem aumentar ou diminuir a resposta inflamatória associada a uma infecção ou lesão de outra origem por uma variedade de mecanismos, dependentes essencialmente do contexto (i.e. inflamação estéril ou não estéril), o que inclui os tecidos afetados, células locais e células recrutadas para o sítio de lesão/infecção. Diversos modelos experimentais têm sugerido um papel benéfico para células iNKT na resposta inflamatória associada a infecções virais e bacterianas (Van Dommelen e Degli-Esposti, 2004; Kim *et al.*, 2008; Emoto e Emoto, 2009; Brigl e Brenner, 2010). Entretanto, células iNKT podem apresentar um perfil deletério em respostas locais e sistêmicas, como por exemplo em modelos de hepatite induzida por concanavalina-A (Toyabe *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 2000) ou no choque séptico induzido por LPS ou CLP (*cecal ligation and puncture*) (Nagarajan e Kronenberg, 2007; Hu *et al.*, 2009).

De forma importante, em experimentos com número elevado de animais, observamos que camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$ , deficientes em células iNKT são resistentes a infecção pelo DENV-2, apresentando mortalidade abaixo de 15% e sobrevivendo por mais de 3 semanas sem nenhum sinal clínico. Complementar a estes achados, a transferência adotiva de células iNKT isoladas do fígado de animais naïve para animais WT foi capaz de reverter parcialmente a mortalidade encontrada em animais  $J\alpha 18^{-/-}$  após a infecção. A reversão parcial do fenótipo, e não completa, pode ser relacionada tanto com a distribuição destes tipos celulares em outros órgãos, que não os imediatamente afetados pela infecção em estágios iniciais, assim como mecanismos inibitórios/apoptóticos diversos aos quais estas podem ter sido expostas no camundongo recipiente. Reversões completas e parciais do fenótipo já foram encontradas em modelos experimentais do grupo do Dr. Trottein (artigos em revisão). Importante também frisar que células iNKT isoladas do fígado são mais puras, não passam por processo de ativação, além de que neste órgão ~90-95% das

células CD5<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> são células iNKT, sendo que no baço esta frequência é bem menor, exigindo etapas que envolvem isolamento com tetrâmeros carregados com glicolípides, o que levaria a ativação desta população.

Análise histológica do fígado de animais infectados no momento onde a doença apresenta maior gravidade revelou menor lesão hepática em animais  $\alpha 18^{-/-}$ . Focos de hemorragia e necrose não foram observados nos animais deficientes para células iNKT, apesar de que alguns leucócitos podem ser observados distribuídos pelo parênquima hepático. Apesar da dosagem de transaminases não ter sido efetuada e as citocinas pró-inflamatórias não apresentarem alteração quando comparamos animais WT e  $\alpha 18^{-/-}$  infectados, a menor lesão hepática parece ser secundária a resposta sistêmica, o que mediará, ainda em momentos iniciais, o desencadeamento de lesão e replicação viral em órgãos alvo. Ainda podemos sugerir que outras citocinas, que não IL-12 e IFN- $\gamma$ , podem ser melhores marcadores desta proteção no sistema avaliado.

Portanto, em nosso modelo, a deficiência em células iNKT reduziu o dano hepático e letalidade associada a infecção, sugerindo que células iNKT são deletérias na resposta fisiopatológica em órgãos alvo, o que parece estar também diretamente relacionado com a mortalidade em função de falência de sistemas fisiológicos elementares, como aqueles dependentes da função hepática. Além do mais, a análise da produção de citocinas indicou que células iNKT parecem orquestrar, seja de forma direta ou indireta, a resposta inflamatória local e sistêmica. Os mecanismos exatos ainda estão indefinidos, mas é possível que as células iNKT estejam entre os maiores produtores de citocinas pró-inflamatórias na infecção experimental pelo DENV-2. Estas citocinas podem contribuir tanto para a ativação de outros tipos celulares envolvidos na doença, como linfócitos e células NK, e consequente manutenção da resposta sistêmica e local, como também podem induzir, diretamente, danos em células e tecidos favorecendo, por exemplo, a disfunção endotelial e a ativação de células residentes (i.e. células epiteliais, hepatócitos e macrófagos).

Como descrito no modelo de hepatite induzida por concanavalina-A (Toyabe *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 2000), e também possível que células iNKT mediem a lesão hepática através da interação FasL-Fas, contribuindo para os efeitos citotóxicos em hepatócitos. Outra possibilidade é que células iNKT participariam de forma direta ou indireta com a produção de IL-17 durante a infecção pelo vírus da

dengue. A citocina IL-17 é capaz de mediar o recrutamento de neutrófilos e a ativação de células epiteliais contribuindo desta forma para a lesão local e para a resposta inflamatória sistêmica (Kolls e Linden, 2004; Iwakura *et al.*, 2008). Camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  infectados apresentam menor expressão de IL-17 no baço em comparação a animais WT (dados não mostrados), o que vai de acordo, por exemplo, com o menor acúmulo e ativação de neutrófilos no baço. Além do mais, demonstramos que IL-17/IL-22 participam de fenômenos envolvidos no controle da resposta inflamatória observada neste modelo de infecção experimental pelo DENV-2 (Guabiraba e colaboradores, em preparação).

De forma contrária a observada em outros modelos, a deficiência em células iNKT não levou a deficiência do *clearance* viral no fígado e no baço de animais infectados em nosso modelo. Alguns trabalhos já demonstraram que células iNKT são dispensáveis para o controle da carga viral em modelos experimentais de infecção pelo HSV-1 e CMV (Van Dommelen *et al.*, 2003; Cornish *et al.*, 2006).

De forma importante, a carga viral se apresentou diminuída no fígado de animais  $J\alpha 18^{-/-}$  infectados no dia 6 p.i quando comparada a de animais WT (~1 log de diferença). Além do mais, no dia 4 p.i. esta diferença é ainda mais nítida, inclusive no baço, sugerindo que os fenômenos envolvidos neste controle da replicação viral acontece em momentos ainda iniciais da infecção. Estudos anteriores sugeriram que a produção de mediadores inflamatórios favorece a replicação *in vivo* e/ou *in vitro* (Lin *et al.*, 2002; Mangada e Rothman, 2005; Kamau *et al.*, 2009).

É possível então que no presente modelo experimental as células iNKT favoreçam a replicação viral promovendo um maior *background* inflamatório, como demonstrado. Uma vez que em camundongos  $J\alpha 18^{-/-}$  infectados a resposta inflamatória está fortemente reduzida, esta regulação positiva da replicação viral estaria também regulada negativamente. Nossos dados demonstram também que, durante a infecção pelo DENV-2, as células iNKT são capazes de produzir IFN- $\gamma$  e que estas células parecem trans-ativar células NK para produzir a citocina. Considerando o importante papel de IFN- $\gamma$  no controle da replicação do DENV (Shresta, Kyle, Robert Beatty, *et al.*, 2004; Azeredo *et al.*, 2006), a ausência de uma função para células iNKT/NK no *clearance* viral é de certa forma surpreendente. O papel de células NK na infecção pelo DENV não é bem estabelecido, entretanto tem sido proposto que estas podem exercer alguma função citotóxica em células

infectadas, embora este tipo de atividade não tenha sido confirmada *in vivo* (Kurane et al., 1984; Green et al., 1999; Azeredo et al., 2006).

De forma importante, a ausência de função para células iNKT/NK no controle direto da replicação viral foi confirmada utilizando-se o glicolípide  $\alpha$ Gal-Cer. Nestes termos, tanto o pré- como o pós-tratamento com  $\alpha$ Gal-Cer, conhecido por induzir uma forte produção de IFN- $\gamma$  por células iNKT e NK *in vivo*, não foi capaz de aumentar de forma apreciável a sobrevivência dos animais infectados assim como não interferiu no controle da replicação viral e das alterações hematológicas decorrentes da infecção. Este é o primeiro relato, até onde conhecemos, de que o  $\alpha$ Gal-Cer, utilizado de uma forma profilática, se mostra incapaz de intervir na replicação viral *in vivo*. Estes dados confirmam a ausência de funções para células iNKT após ativação utilizando um agonista natural deste tipo celular. Além do mais, estes dados sugerem que uma cascata de eventos envolvendo desde o reconhecimento do vírus por APCs, até a produção de citocinas/quimiocinas por células da imunidade inata e adquirida, são responsáveis por desencadear a ativação e função efetora de células iNKT na fisiopatologia da infecção pelo DENV.

Em termos gerais, nossos dados demonstraram um papel fundamental para células iNKT no desenvolvimento da fisiopatologia e na mortalidade associadas a infecção experimental pelo DENV-2. Uma melhor compreensão dos mecanismos acerca da ativação *in vivo* desta população celular e suas funções durante a infecção podem levar a estratégias terapêuticas como, por exemplo, a inibição desta população em manifestações graves da doença. Este tipo de estratégia pode ser principalmente através da co-inibição de quimiocinas envolvidas no recrutamento destas células assim como possíveis antagonistas/inibidores da ativação de células iNKT.

## **VI. CONCLUSÃO**

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados aqui discutidos sugerem um importante e ainda não discutido papel para os receptores de quimiocinas da família CC, CCR1, CCR2 e CCR4, na patogênese da infecção experimental pelo dengue. Estes receptores, especialmente CCR2 e CCR4, parecem estar diretamente ligados com a progressão da doença e sua associação direta com a inflamação sistêmica e local induzida pela produção maciça de mediadores inflamatórios, especialmente quimiocinas. Neste contexto, diversos tipos celulares recrutados e ativados durante a infecção podem participar dos eventos que levam a FHD/SCD, sendo que células iNKT parecem ser fundamentais e contribuem diretamente para a produção exacerbada de mediadores inflamatórios, ainda em momentos iniciais da infecção, e estão associadas a gravidade da doença. Apesar de ainda não relacionarmos os receptores para quimiocinas diretamente envolvidos com células iNKT no presente modelo, é possível que CCR2, CCR4 e outros CCRs colaborem neste processo de recrutamento e ativação de células NKT invariáveis. Acreditamos que o presente trabalho de tese abre duas frentes de estudo para intervenções terapêuticas na imunopatologia da dengue: receptores para quimiocinas da família CC e células iNKT.



## **VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Cellular and molecular immunology*. 5th. ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2005.

\_\_\_\_\_. *Basic immunology : functions and disorders of the immune system*. 3rd. ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2009.

AJUEBOR, M. N. *et al.* CCL3/MIP-1alpha is pro-inflammatory in murine T cell-mediated hepatitis by recruiting CCR1-expressing CD4(+) T cells to the liver. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 34, n. 10, p. 2907-18, Oct 2004.

ALLEN, S. J. *et al.* Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* [S.I.], v. 25, p. 787-820, 2007.

AMBROSINO, E. *et al.* Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *J Immunol* [S.I.], v. 179, n. 8, p. 5126-36, Oct 15 2007.

ARRENBERG, P. *et al.* Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol* [S.I.], v. 218, n. 2, p. 246-50, Feb 2009.

ASHKAR, A. A.; ROSENTHAL, K. L. Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol* [S.I.], v. 77, n. 18, p. 10168-71, Sep 2003.

ASSUNCAO-MIRANDA, I. *et al.* Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J* [S.I.], v. 24, n. 1, p. 218-28, Jan 2010.

ATRASHEUSKAYA, A. *et al.* Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* [S.I.], v. 35, n. 1, p. 33-42, Jan 21 2003.

AVIRUTNAN, P. *et al.* Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol* [S.I.], v. 161, n. 11, p. 6338-46, Dec 1 1998.

AZEREDO, E. L. *et al.* NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol* [S.I.], v. 143, n. 2, p. 345-56, Feb 2006.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* [S.I.], v. 392, n. 6676, p. 565-8, Apr 9 1998.

BALMASEDA, A. *et al.* Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 74, n. 3, p. 449-56, Mar 2006.

- BARRAL, D. C.; BRENNER, M. B. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol* [S.I.], v. 7, n. 12, p. 929-41, Dec 2007.
- BENDELAC, A. *et al.* The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* [S.I.], v. 25, p. 297-336, 2007.
- BINH, P. T. *et al.* Early clinical and biological features of severe clinical manifestations of dengue in Vietnamese adults. *J Clin Virol* [S.I.], v. 45, n. 4, p. 276-80, Aug 2009.
- BOKISCH, V. A. *et al.* The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. *N Engl J Med* [S.I.], v. 289, n. 19, p. 996-1000, Nov 8 1973.
- BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* [S.I.], v. 111, n. 2 Suppl, p. S460-75, Feb 2003.
- BOUROS, D. *et al.* The clinical significance of serum and bronchoalveolar lavage inflammatory cytokines in patients at risk for Acute Respiratory Distress Syndrome. *BMC Pulm Med* [S.I.], v. 4, p. 6, Aug 17 2004.
- BOZZA, F. A. *et al.* Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* [S.I.], v. 8, p. 86, 2008.
- \_\_\_\_\_. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* [S.I.], v. 11, n. 2, p. R49, 2007.
- BRIGL, M.; BRENNER, M. B. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Semin Immunol* [S.I.], v. 22, n. 2, p. 79-86, Apr 2010.
- CAMPBELL, J. J. *et al.* Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* [S.I.], v. 166, n. 11, p. 6477-82, Jun 1 2001.
- CARDONA, A. E. *et al.* Scavenging roles of chemokine receptors: chemokine receptor deficiency is associated with increased levels of ligand in circulation and tissues. *Blood* [S.I.], v. 112, n. 2, p. 256-63, Jul 15 2008.
- CARROLL, M. C. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* [S.I.], v. 16, p. 545-68, 1998.
- CERUNDOLO, V. *et al.* Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 28-38, Jan 2009.
- CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* [S.I.], v. 44, p. 649-88, 1990.
- CHATURVEDI, U. C. Tumour necrosis factor & dengue. *Indian J Med Res* [S.I.], v. 123, n. 1, p. 11-4, Jan 2006.

- CHATURVEDI, U. C. *et al.* Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* [S.I.], v. 28, n. 3, p. 183-8, Jul 2000.
- CHAU, T. N. *et al.* Dengue in Vietnamese infants--results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *J Infect Dis* [S.I.], v. 198, n. 4, p. 516-24, Aug 15 2008.
- CHEN, Y. *et al.* Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* [S.I.], v. 3, n. 8, p. 866-71, Aug 1997.
- CHEN, Y. C. *et al.* Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol* [S.I.], v. 73, n. 4, p. 2650-7, Apr 1999.
- CHENG, S. S. *et al.* Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils. *J Immunol* [S.I.], v. 166, n. 2, p. 1178-84, Jan 15 2001.
- CHIBA, A. *et al.* Rapid NKT cell responses are self-terminating during the course of microbial infection. *J Immunol* [S.I.], v. 181, n. 4, p. 2292-302, Aug 15 2008.
- CHO, S. *et al.* Impaired cell surface expression of human CD1d by the formation of an HIV-1 Nef/CD1d complex. *Virology* [S.I.], v. 337, n. 2, p. 242-52, Jul 5 2005.
- CHUA, J. J. *et al.* Recombinant non-structural 1 (NS1) protein of dengue-2 virus interacts with human STAT3beta protein. *Virus Res* [S.I.], v. 112, n. 1-2, p. 85-94, Sep 2005.
- CHUNGUE, E. *et al.* Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. *J Infect Dis* [S.I.], v. 170, n. 5, p. 1304-7, Nov 1994.
- CHVATCHKO, Y. *et al.* A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Exp Med* [S.I.], v. 191, n. 10, p. 1755-64, May 15 2000.
- CLYDE, K. *et al.* Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* [S.I.], v. 80, n. 23, p. 11418-31, Dec 2006.
- COMMINS, S. P. *et al.* Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* [S.I.], v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S53-72, Feb 2010.
- CONCEICAO, T. M. *et al.* Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *J Infect* [S.I.], v. 60, n. 1, p. 65-75, Jan 2010.
- CORNISH, A. L. *et al.* NKT cells are not critical for HSV-1 disease resolution. *Immunol Cell Biol* [S.I.], v. 84, n. 1, p. 13-9, Feb 2006.
- DE LALLA, C. *et al.* Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J Immunol* [S.I.], v. 173, n. 2, p. 1417-25, Jul 15 2004.

- DE SILVA, A. D. *et al.* Lipid protein interactions: the assembly of CD1d1 with cellular phospholipids occurs in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* [S.I.], v. 168, n. 2, p. 723-33, Jan 15 2002.
- DEEN, J. L. *et al.* The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* [S.I.], v. 368, n. 9530, p. 170-3, Jul 8 2006.
- DESHMANE, S. L. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* [S.I.], v. 29, n. 6, p. 313-26, Jun 2009.
- DEWI, B. E. *et al.* In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J Virol Methods* [S.I.], v. 121, n. 2, p. 171-80, Nov 2004.
- DI STASI, A. *et al.* T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood* [S.I.], v. 113, n. 25, p. 6392-402, Jun 18 2009.
- DIAMOND, M. S. Mechanisms of evasion of the type I interferon antiviral response by flaviviruses. *J Interferon Cytokine Res* [S.I.], v. 29, n. 9, p. 521-30, Sep 2009.
- DONG, Z. *et al.* Impairment of liver regeneration correlates with activated hepatic NKT cells in HBV transgenic mice. *Hepatology* [S.I.], v. 45, n. 6, p. 1400-12, Jun 2007.
- DORNER, B. G. *et al.* Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity* [S.I.], v. 31, n. 5, p. 823-33, Nov 20 2009.
- EBERL, G. *et al.* Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J Immunol* [S.I.], v. 162, n. 11, p. 6410-9, Jun 1 1999.
- EMOTO, M.; EMOTO, Y. Intracellular bacterial infection and invariant NKT cells. *Yonsei Med J* [S.I.], v. 50, n. 1, p. 12-21, Feb 28 2009.
- EMOTO, M. *et al.* Critical role of leukocyte function-associated antigen-1 in liver accumulation of CD4+NKT cells. *J Immunol* [S.I.], v. 162, n. 9, p. 5094-8, May 1 1999.
- EXLEY, M. A. *et al.* Innate immune response to encephalomyocarditis virus infection mediated by CD1d. *Immunology* [S.I.], v. 110, n. 4, p. 519-26, Dec 2003.
- \_\_\_\_\_. Cutting edge: Compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus-infected liver. *J Immunol* [S.I.], v. 168, n. 4, p. 1519-23, Feb 15 2002.
- FALCONAR, A. K. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* [S.I.], v. 142, n. 5, p. 897-916, 1997.
- FAUCI, A. S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* [S.I.], v. 384, n. 6609, p. 529-34, Dec 12 1996.

FAUNCE, D. E. *et al.* MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *J Immunol* [S.I.], v. 166, n. 1, p. 313-21, Jan 1 2001.

FAUNCE, D. E.; STEIN-STREILEIN, J. NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8<sup>+</sup> T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J Immunol* [S.I.], v. 169, n. 1, p. 31-8, Jul 1 2002.

FINK, K. *et al.* Depletion of macrophages in mice results in higher dengue virus titers and highlights the role of macrophages for virus control. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 39, n. 10, p. 2809-21, Oct 2009.

FURUICHI, K. *et al.* Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* [S.I.], v. 181, n. 12, p. 8670-6, Dec 15 2008.

GERMI, R. *et al.* Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* [S.I.], v. 292, n. 1, p. 162-8, Jan 5 2002.

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. *BMJ* [S.I.], v. 324, n. 7353, p. 1563-6, Jun 29 2002.

GLASS, W. G. *et al.* Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med* [S.I.], v. 202, n. 8, p. 1087-98, Oct 17 2005.

\_\_\_\_\_. Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* [S.I.], v. 3, n. 6, p. 467-73, Dec 2003.

GODFREY, D. I. *et al.* CD1d antigen presentation: treats for NKT cells. *Nat Immunol* [S.I.], v. 6, n. 8, p. 754-6, Aug 2005.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* [S.I.], v. 371, n. 9611, p. 500-9, Feb 9 2008.

GREEN, S. *et al.* Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* [S.I.], v. 180, n. 5, p. 1429-35, Nov 1999.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* [S.I.], v. 19, n. 5, p. 429-36, Oct 2006.

GRUBOR-BAUK, B. *et al.* Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol* [S.I.], v. 170, n. 3, p. 1430-4, Feb 1 2003.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 480-96, Jul 1998.

GUMPERZ, J. E. *et al.* Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* [S.I.], v. 195, n. 5, p. 625-36, Mar 4 2002.

GUZMAN, M. G. *et al.* Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis* [S.I.], v. 6, n. 2, p. 118-24, Jun 2002.

\_\_\_\_\_. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 42, n. 2, p. 179-84, Feb 1990.

HALDER, R. C. *et al.* Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. *J Clin Invest* [S.I.], v. 117, n. 8, p. 2302-12, Aug 2007.

HALSTEAD, S. B. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis* [S.I.], v. 140, n. 4, p. 527-33, Oct 1979.

\_\_\_\_\_. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* [S.I.], v. 58, n. 1, p. 1-21, 1980.

\_\_\_\_\_. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev Infect Dis* [S.I.], v. 11 Suppl 4, p. S830-9, May-Jun 1989.

\_\_\_\_\_. Dengue. *Lancet* [S.I.], v. 370, n. 9599, p. 1644-52, Nov 10 2007.

HANSEN, D. S. *et al.* Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity* [S.I.], v. 18, n. 3, p. 391-402, Mar 2003.

HAROUSE, J. M. *et al.* Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* [S.I.], v. 253, n. 5017, p. 320-3, Jul 19 1991.

\_\_\_\_\_. Entry of human immunodeficiency virus-1 into glial cells proceeds via an alternate, efficient pathway. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 49, n. 6, p. 605-9, Jun 1991.

HAYES, E. B.; GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J* [S.I.], v. 11, n. 4, p. 311-7, Apr 1992.

HIROMATSU, T. *et al.* NK T cells stimulated with a ligand for TLR2 at least partly contribute to liver injury caused by Escherichia coli infection in mice. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 33, n. 9, p. 2511-9, Sep 2003.

HOBBER, D. *et al.* High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengue-infected patients. *Microbiol Immunol* [S.I.], v. 40, n. 8, p. 569-73, 1996.

\_\_\_\_\_. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 324-31, Mar 1993.

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

HU, C. K. *et al.* The role of hepatic invariant NKT cells in systemic/local inflammation and mortality during polymicrobial septic shock. *J Immunol* [S.I.], v. 182, n. 4, p. 2467-75, Feb 15 2009.

- ILYINSKII, P. O. *et al.* CD1d mediates T-cell-dependent resistance to secondary infection with encephalomyocarditis virus (EMCV) in vitro and immune response to EMCV infection in vivo. *J Virol* [S.I.], v. 80, n. 14, p. 7146-58, Jul 2006.
- INOUE, M. *et al.* Enhanced ability of peripheral invariant natural killer T cells to produce IL-13 in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* [S.I.], v. 45, n. 2, p. 190-6, Aug 2006.
- IWAKURA, Y. *et al.* The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev* [S.I.], v. 226, p. 57-79, Dec 2008.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* [S.I.], v. 5, n. 10, p. 987-95, Oct 2004.
- JAN, M. S. *et al.* CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation, and alpha-defensin release. *J Acquir Immune Defic Syndr* [S.I.], v. 41, n. 1, p. 6-16, Jan 1 2006.
- JESSIE, K. *et al.* Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* [S.I.], v. 189, n. 8, p. 1411-8, Apr 15 2004.
- JINDADAMRONGWECH, S. *et al.* Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* [S.I.], v. 149, n. 5, p. 915-27, May 2004.
- JOHNSON, T. R. *et al.* NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. *J Virol* [S.I.], v. 76, n. 9, p. 4294-303, May 2002.
- JOHNSON, Z. *et al.* Interference with heparin binding and oligomerization creates a novel anti-inflammatory strategy targeting the chemokine system. *J Immunol* [S.I.], v. 173, n. 9, p. 5776-85, Nov 1 2004.
- JOHNSTON, B. *et al.* Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *J Clin Invest* [S.I.], v. 103, n. 9, p. 1269-76, May 1999.
- JOHNSTON, B.; BUTCHER, E. C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol* [S.I.], v. 14, n. 2, p. 83-92, Apr 2002.
- JOYCE, S.; VAN KAER, L. CD1-restricted antigen presentation: an oily matter. *Curr Opin Immunol* [S.I.], v. 15, n. 1, p. 95-104, Feb 2003.
- JOYCE, S. *et al.* Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science* [S.I.], v. 279, n. 5356, p. 1541-4, Mar 6 1998.
- JUFFRIE, M. *et al.* Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect Immun* [S.I.], v. 68, n. 2, p. 702-7, Feb 2000.



KAKIMI, K. *et al.* Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* [S.I.], v. 192, n. 7, p. 921-30, Oct 2 2000.

\_\_\_\_\_. Cutting edge: Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol* [S.I.], v. 167, n. 12, p. 6701-5, Dec 15 2001.

KALAYANAROOJ, S. *et al.* Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis* [S.I.], v. 176, n. 2, p. 313-21, Aug 1997.

KAMAU, E. *et al.* Dengue virus infection promotes translocation of high mobility group box 1 protein from the nucleus to the cytosol in dendritic cells, upregulates cytokine production and modulates virus replication. *J Gen Virol* [S.I.], v. 90, n. Pt 8, p. 1827-35, Aug 2009.

KAWAKAMI, K. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V alpha 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *J Immunol* [S.I.], v. 167, n. 11, p. 6525-32, Dec 1 2001.

KAWANA, K. *et al.* CD1d degradation in Chlamydia trachomatis-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity. *J Biol Chem* [S.I.], v. 282, n. 10, p. 7368-75, Mar 9 2007.

KAWANO, T. *et al.* CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V alpha 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* [S.I.], v. 278, n. 5343, p. 1626-9, Nov 28 1997.

KIM, C. H. *et al.* Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* [S.I.], v. 100, n. 1, p. 11-6, Jul 1 2002.

\_\_\_\_\_. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* [S.I.], v. 108, n. 9, p. 1331-9, Nov 2001.

KIM, S. *et al.* Impact of bacteria on the phenotype, functions, and therapeutic activities of invariant NKT cells in mice. *J Clin Invest* [S.I.], v. 118, n. 6, p. 2301-15, Jun 2008.

KING, C. A. *et al.* Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. *J Virol* [S.I.], v. 76, n. 16, p. 8408-19, Aug 2002.

KINJO, Y. *et al.* Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* [S.I.], v. 434, n. 7032, p. 520-5, Mar 24 2005.

KLEIN, R. S.; DIAMOND, M. S. Immunological headgear: antiviral immune responses protect against neuroinvasive West Nile virus. *Trends Mol Med* [S.I.], v. 14, n. 7, p. 286-94, Jul 2008.

KOLLS, J. K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 467-76, Oct 2004.

KRONENBERG, M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* [S.I.], v. 23, p. 877-900, 2005.

KUNKEL, E. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* [S.I.], v. 16, n. 1, p. 1-4, Jan 2002.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [S.I.], v. 30, n. 5-6, p. 329-40, Sep 2007.

KURANE, I. *et al.* Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol* [S.I.], v. 52, n. 1, p. 223-30, Oct 1984.

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

KYLE, J. L. *et al.* Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. *Virology* [S.I.], v. 380, n. 2, p. 296-303, Oct 25 2008.

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

LEE, P. T. *et al.* Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* [S.I.], v. 195, n. 5, p. 637-41, Mar 4 2002.

LEE, Y. R. *et al.* MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol* [S.I.], v. 87, n. Pt 12, p. 3623-30, Dec 2006.

LEVITSKY, H. I. *et al.* The fate of CD4-8- T cell receptor-alpha beta+ thymocytes. *J Immunol* [S.I.], v. 146, n. 4, p. 1113-7, Feb 15 1991.

LI, D.; XU, X. N. NKT cells in HIV-1 infection. *Cell Res* [S.I.], v. 18, n. 8, p. 817-22, Aug 2008.

LIBRATY, D. H. *et al.* Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* [S.I.], v. 185, n. 9, p. 1213-21, May 1 2002.

LICHTERFELD, M. *et al.* Reduced CC chemokine receptor (CCR) 1 and CCR5 surface expression on peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis C infection. *J Infect Dis* [S.I.], v. 185, n. 12, p. 1803-7, Jun 15 2002.

LIM, J. K. *et al.* CCR5: no longer a "good for nothing" gene--chemokine control of West Nile virus infection. *Trends Immunol* [S.I.], v. 27, n. 7, p. 308-12, Jul 2006.

\_\_\_\_\_. Genetic deficiency of chemokine receptor CCR5 is a strong risk factor for symptomatic West Nile virus infection: a meta-analysis of 4 cohorts in the US epidemic. *J Infect Dis* [S.I.], v. 197, n. 2, p. 262-5, Jan 15 2008.

\_\_\_\_\_. CCR5 deficiency is a risk factor for early clinical manifestations of West Nile virus infection but not for viral transmission. *J Infect Dis* [S.I.], v. 201, n. 2, p. 178-85, Jan 15 2010.

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

\_\_\_\_\_. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol* [S.I.], v. 69, n. 1, p. 82-90, Jan 2003.

\_\_\_\_\_. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol* [S.I.], v. 19, n. 2, p. 127-32, Summer 2006.

LIN, Y. L. *et al.* Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology* [S.I.], v. 276, n. 1, p. 114-26, Oct 10 2000.

LIN, Y. W. *et al.* Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol* [S.I.], v. 76, n. 23, p. 12242-9, Dec 2002.

LIU, C. C. *et al.* Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. *J Med Virol* [S.I.], v. 68, n. 2, p. 241-52, Oct 2002.

LOCATI, M.; MURPHY, P. M. Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med* [S.I.], v. 50, p. 425-40, 1999.

LOCATI, M. *et al.* The chemokine system: tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses. *Allergy* [S.I.], v. 57, n. 11, p. 972-82, Nov 2002.

LOZACH, P. Y. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem* [S.I.], v. 280, n. 25, p. 23698-708, Jun 24 2005.

LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* [S.I.], v. 338, n. 7, p. 436-45, Feb 12 1998.

\_\_\_\_\_. Antichemokine immunotherapy for allergic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* [S.I.], v. 1, n. 6, p. 561-7, Dec 2001.

MACKENZIE, J. S. *et al.* Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* [S.I.], v. 10, n. 12 Suppl, p. S98-109, Dec 2004.

MADIGAN, M. T. *et al.* *Brock biology of microorganisms*. 11th. ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2006.

MAJOR, A. S. *et al.* Lipid metabolism, atherogenesis and CD1-restricted antigen presentation. *Trends Mol Med* [S.I.], v. 12, n. 6, p. 270-8, Jun 2006.

- MAKINO, Y. *et al.* Development of Valpha4+ NK T cells in the early stages of embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 93, n. 13, p. 6516-20, Jun 25 1996.
- MALASIT, P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* [S.I.], v. 18, n. 3, p. 316-20, Sep 1987.
- MANGADA, M. M. *et al.* Quantitation of dengue virus specific CD4+ T cells by intracellular cytokine staining. *J Immunol Methods* [S.I.], v. 284, n. 1-2, p. 89-97, Jan 2004.
- MANGADA, M. M.; ROTHMAN, A. L. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J Immunol* [S.I.], v. 175, n. 4, p. 2676-83, Aug 15 2005.
- MANTOVANI, A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* [S.I.], v. 20, n. 6, p. 254-7, Jun 1999.
- MANTOVANI, A. *et al.* Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* [S.I.], v. 6, n. 12, p. 907-18, Dec 2006.
- MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Housekeeping by chemokine scavenging. *Blood* [S.I.], v. 112, n. 2, p. 215-6, Jul 15 2008.
- MARCHESE, A. Ubiquitination of chemokine receptors. *Methods Enzymol* [S.I.], v. 460, p. 413-22, 2009.
- MARGOLIUS, H. S. Theodore Cooper Memorial Lecture. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. *Hypertension* [S.I.], v. 26, n. 2, p. 221-9, Aug 1995.
- MARKOFF, L. J. *et al.* Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J Infect Dis* [S.I.], v. 164, n. 2, p. 294-301, Aug 1991.
- MARTINA, B. E. *et al.* Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* [S.I.], v. 22, n. 4, p. 564-81, Oct 2009.
- MATSUDA, J. L. *et al.* CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol* [S.I.], v. 20, n. 3, p. 358-68, Jun 2008.
- MATSUKAWA, A. *et al.* Pivotal role of the CC chemokine, macrophage-derived chemokine, in the innate immune response. *J Immunol* [S.I.], v. 164, n. 10, p. 5362-8, May 15 2000.
- MATSUKURA, S. *et al.* Expression of RANTES by normal airway epithelial cells after influenza virus A infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 255-64, Feb 1998.
- MATSUMOTO, G. *et al.* Adhesion mediated by LFA-1 is required for efficient IL-12-induced NK and NKT cell cytotoxicity. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 30, n. 12, p. 3723-31, Dec 2000.

- MAXIMOVA, O. A. *et al.* Cellular inflammatory response to flaviviruses in the central nervous system of a primate host. *J Histochem Cytochem* [S.I.], v. 57, n. 10, p. 973-89, Oct 2009.
- MEDIN, C. L. *et al.* Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol* [S.I.], v. 79, n. 17, p. 11053-61, Sep 2005.
- MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* [S.I.], v. 449, n. 7164, p. 819-26, Oct 18 2007.
- MESSER, W. B. *et al.* Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 9, n. 7, p. 800-9, Jul 2003.
- \_\_\_\_\_. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 66, n. 6, p. 765-73, Jun 2002.
- MILLER, J. L. *et al.* The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog* [S.I.], v. 4, n. 2, p. e17, Feb 8 2008.
- MIYAMOTO, M. *et al.* Cutting edge: contribution of NK cells to the homing of thymic CD4+NKT cells to the liver. *J Immunol* [S.I.], v. 165, n. 4, p. 1729-32, Aug 15 2000.
- MONATH, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 91, n. 7, p. 2395-400, Mar 29 1994.
- MORENS, D. M. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 500-12, Sep 1994.
- MORIUCHI, H. *et al.* CD8+ T-cell-derived soluble factor(s), but not beta-chemokines RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 93, n. 26, p. 15341-5, Dec 24 1996.
- MOTSINGER, A. *et al.* CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* [S.I.], v. 195, n. 7, p. 869-79, Apr 1 2002.
- MURPHY, P. M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* [S.I.], v. 12, p. 593-633, 1994.
- MURRAY, P. R. *et al.* *Medical microbiology*. 5th. ed. Philadelphia: Mosby, 2005.
- NAGARAJAN, N. A.; KRONENBERG, M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J Immunol* [S.I.], v. 178, n. 5, p. 2706-13, Mar 1 2007.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature* [S.I.], v. 420, n. 6917, p. 846-52, Dec 19-26 2002.

NATTERMANN, J. *et al.* Binding of HCV E2 to CD81 induces RANTES secretion and internalization of CC chemokine receptor 5. *J Viral Hepat* [S.I.], v. 11, n. 6, p. 519-26, Nov 2004.

\_\_\_\_\_. Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. *Hepatology* [S.I.], v. 44, n. 4, p. 945-54, Oct 2006.

NAVARRO-SANCHEZ, E. *et al.* Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* [S.I.], v. 4, n. 7, p. 723-8, Jul 2003.

\_\_\_\_\_. Innate immune responses to dengue virus. *Arch Med Res* [S.I.], v. 36, n. 5, p. 425-35, Sep-Oct 2005.

NEEL, N. F. *et al.* Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev* [S.I.], v. 16, n. 6, p. 637-58, Dec 2005.

NEVES-SOUZA, P. C. *et al.* Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis* [S.I.], v. 5, p. 64, 2005.

NEW, D. C.; WONG, Y. H. CC chemokine receptor-coupled signalling pathways. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* [S.I.], v. 35, n. 9, p. 779-88, Sep 2003.

NOURI-ARIA, K. T. *et al.* CCR4 in human allergen-induced late responses in the skin and lung. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 32, n. 7, p. 1933-8, Jul 2002.

OGILVIE, P. *et al.* Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* [S.I.], v. 97, n. 7, p. 1920-4, Apr 1 2001.

\_\_\_\_\_. Eotaxin-3 is a natural antagonist for CCR2 and exerts a repulsive effect on human monocytes. *Blood* [S.I.], v. 102, n. 3, p. 789-94, Aug 1 2003.

PANG, T. *et al.* Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* [S.I.], v. 85, n. 1, p. 43-5, Jan 2007.

PAREKH, V. V. *et al.* iNKT-cell responses to glycolipids. *Crit Rev Immunol* [S.I.], v. 25, n. 3, p. 183-213, 2005.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev Mol Med* [S.I.], v. 10, p. e12, 2008.

PROUDFOOT, A. E. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* [S.I.], v. 2, n. 2, p. 106-15, Feb 2002.

PROUDFOOT, A. E. *et al.* Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 100, n. 4, p. 1885-90, Feb 18 2003.

- RAFTERY, M. J. *et al.* Viral danger signals control CD1d de novo synthesis and NKT cell activation. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 38, n. 3, p. 668-79, Mar 2008.
- RAMOS, C. D. *et al.* Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1alpha, TNF-alpha and LTB(4). *Eur J Immunol* [S.I.], v. 36, n. 8, p. 2025-34, Aug 2006.
- REICHEL, C. A. *et al.* Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 79, n. 1, p. 114-22, Jan 2006.
- REYES-DEL VALLE, J. *et al.* Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* [S.I.], v. 79, n. 8, p. 4557-67, Apr 2005.
- RIGAU-PEREZ, J. G. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 59, n. 2, p. 272-4, Aug 1998.
- \_\_\_\_\_. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* [S.I.], v. 6, n. 5, p. 297-302, May 2006.
- RILEY, J. L. *et al.* Naive and memory CD4 T cells differ in their susceptibilities to human immunodeficiency virus type 1 infection following CD28 costimulation: implicatip6s for transmission and pathogenesis. *J Virol* [S.I.], v. 72, n. 10, p. 8273-80, Oct 1998.
- ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* [S.I.], v. 26, n. 3, p. 337-43, May 1977.
- ROSENKILDE, M. M.; SCHWARTZ, T. W. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS* [S.I.], v. 112, n. 7-8, p. 481-95, Jul-Aug 2004.
- ROTHMAN, A. L. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Virus Res* [S.I.], v. 60, p. 397-419, 2003.
- \_\_\_\_\_. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* [S.I.], v. 113, n. 7, p. 946-51, Apr 2004.
- SAITO, M. *et al.* Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin Exp Immunol* [S.I.], v. 138, n. 2, p. 299-303, Nov 2004.
- SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res* [S.I.], v. 81, n. 1, p. 6-15, Jan 2009.
- SCHALL, T. J. *et al.* Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* [S.I.], v. 347, n. 6294, p. 669-71, Oct 18 1990.
- SCHUH, J. M. *et al.* Airway hyperresponsiveness, but not airway remodeling, is attenuated during chronic pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR4-/- mice. *FASEB J* [S.I.], v. 16, n. 10, p. 1313-5, Aug 2002.

SCOTT, R. M. *et al.* Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *J Infect Dis* [S.I.], v. 141, n. 1, p. 1-6, Jan 1980.

SEKI, S. *et al.* Antimetastatic effect of NK1+ T cells on experimental haematogenous tumour metastases in the liver and lungs of mice. *Immunology* [S.I.], v. 92, n. 4, p. 561-6, Dec 1997.

SEMMLING, V. *et al.* Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nat Immunol* [S.I.], v. 11, n. 4, p. 313-20, Apr 2010.

SHARIF, S. *et al.* Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells. *J Mol Med* [S.I.], v. 80, n. 5, p. 290-300, May 2002.

\_\_\_\_\_. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* [S.I.], v. 7, n. 9, p. 1057-62, Sep 2001.

SHIMIZU, H. *et al.* Toll-like receptor 2 contributes to liver injury by Salmonella infection through Fas ligand expression on NKT cells in mice. *Gastroenterology* [S.I.], v. 123, n. 4, p. 1265-77, Oct 2002.

SHRESTA, S. *et al.* Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology* [S.I.], v. 319, n. 2, p. 262-73, Feb 20 2004.

\_\_\_\_\_. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol* [S.I.], v. 78, n. 6, p. 2701-10, Mar 2004.

\_\_\_\_\_. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol* [S.I.], v. 80, n. 20, p. 10208-17, Oct 2006.

SIERRA, B. *et al.* MCP-1 and MIP-1alpha expression in a model resembling early immune response to dengue. *Cytokine* [S.I.], Jul 21 2010.

SOUZA, D. G. *et al.* Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 106, n. 33, p. 14138-43, Aug 18 2009.

\_\_\_\_\_. IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *J Immunol* [S.I.], v. 170, n. 9, p. 4759-66, May 1 2003.

SPAIN-SANTANA, T. A. *et al.* MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. *J Med Virol* [S.I.], v. 65, n. 2, p. 324-30, Oct 2001.

SPEYER, C. L. *et al.* Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am J Pathol* [S.I.], v. 165, n. 6, p. 2187-96, Dec 2004.

SRIKIATKHACHORN, A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thromb Haemost* [S.I.], v. 102, n. 6, p. 1042-9, Dec 2009.



SRIKIATKHACHORN, A. *et al.* Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. *Pediatr Infect Dis J* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 283-90; discussion 291-2, Apr 2007.

STAMATOVIC, S. M. *et al.* Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. *J Cell Sci* [S.I.], v. 116, n. Pt 22, p. 4615-28, Nov 15 2003.

STEINKE, J. W.; BORISH, L. 3. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* [S.I.], v. 117, n. 2 Suppl Mini-Primer, p. S441-5, Feb 2006.

STEPHENSON, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ* [S.I.], v. 83, n. 4, p. 308-14, Apr 2005.

SUKSANPAISAN, L. *et al.* Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *J Med Virol* [S.I.], v. 79, n. 3, p. 300-7, Mar 2007.

SUTHAR, M. S. *et al.* Evasion and disruption of innate immune signalling by hepatitis C and West Nile viruses. *Cell Microbiol* [S.I.], v. 11, n. 6, p. 880-8, Jun 2009.

SUZUKI, Y. *et al.* Liposome-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides as a potent adjuvant for inducing type 1 innate immunity. *Cancer Res* [S.I.], v. 64, n. 23, p. 8754-60, Dec 1 2004.

SWAIN, M. G. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin Sci (Lond)* [S.I.], v. 114, n. 7, p. 457-66, Apr 2008.

TAKEDA, K. *et al.* Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 97, n. 10, p. 5498-503, May 9 2000.

TASSANEETRITHEP, B. *et al.* DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* [S.I.], v. 197, n. 7, p. 823-9, Apr 7 2003.

THELEN, M. *et al.* Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. *Curr Opin Pharmacol* [S.I.], v. 10, n. 1, p. 38-43, Feb 2010.

THELEN, M.; STEIN, J. V. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol* [S.I.], v. 9, n. 9, p. 953-9, Sep 2008.

THEOFILOPOULOS, A. N. *et al.* Replication of dengue-2 virus in cultured human lymphoblastoid cells and subpopulations of human peripheral leukocytes. *J Immunol* [S.I.], v. 117, n. 3, p. 953-61, Sep 1976.

THOMAS, L. H. *et al.* Respiratory syncytial virus-induced RANTES production from human bronchial epithelial cells is dependent on nuclear factor-kappa B nuclear binding and is inhibited by adenovirus-mediated expression of inhibitor of kappa B alpha. *J Immunol* [S.I.], v. 161, n. 2, p. 1007-16, Jul 15 1998.

THOMAS, S. Y. *et al.* CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *J Immunol* [S.I.], v. 171, n. 5, p. 2571-80, Sep 1 2003.

TORTORA, G. J. *et al.* *Microbiology : an introduction*. 7th. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2002.

TOYABE, S. *et al.* Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Immunol* [S.I.], v. 159, n. 3, p. 1537-42, Aug 1 1997.

TRAEGER, T. *et al.* Detrimental role of CC chemokine receptor 4 in murine polymicrobial sepsis. *Infect Immun* [S.I.], v. 76, n. 11, p. 5285-93, Nov 2008.

TUPIN, E. *et al.* The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* [S.I.], v. 5, n. 6, p. 405-17, Jun 2007.

TYZNIK, A. J. *et al.* Cutting edge: the mechanism of invariant NKT cell responses to viral danger signals. *J Immunol* [S.I.], v. 181, n. 7, p. 4452-6, Oct 1 2008.

VAN DOMMELEN, S. L.; DEGLI-ESPOSTI, M. A. NKT cells and viral immunity. *Immunol Cell Biol* [S.I.], v. 82, n. 3, p. 332-41, Jun 2004.

VAN DOMMELEN, S. L. *et al.* Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J Virol* [S.I.], v. 77, n. 3, p. 1877-84, Feb 2003.

VAN KAER, L.; JOYCE, S. Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr Biol* [S.I.], v. 15, n. 11, p. R429-31, Jun 7 2005.

\_\_\_\_\_. Viral evasion of antigen presentation: not just for peptides anymore. *Nat Immunol* [S.I.], v. 7, n. 8, p. 795-7, Aug 2006.

VAN RHIJN, I. *et al.* CD1c bypasses lysosomes to present a lipopeptide antigen with 12 amino acids. *J Exp Med* [S.I.], v. 206, n. 6, p. 1409-22, Jun 8 2009.

VAUGHN, D. W. *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* [S.I.], v. 181, n. 1, p. 2-9, Jan 2000.

VIJAYANAND, P. *et al.* Chemokine receptor 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients. *J Immunol* [S.I.], v. 184, n. 8, p. 4568-74, Apr 15.

VITARANA, T. *et al.* Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med J* [S.I.], v. 36, n. 2, p. 63-5, Jun 1991.

WATTS, D. M. *et al.* Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* [S.I.], v. 354, n. 9188, p. 1431-4, Oct 23 1999.

WHITEHEAD, S. S. *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* [S.I.], v. 5, n. 7, p. 518-28, Jul 2007.

WOLTMAN, A. M. *et al.* Alpha-galactosylceramide in chronic hepatitis B infection: results from a randomized placebo-controlled Phase I/II trial. *Antivir Ther* [S.I.], v. 14, n. 6, p. 809-18, 2009.

WRIGHT, H. *et al.* Multiplex cytokine profiling of initial therapeutic response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Dig Dis Sci* [S.I.], v. 50, n. 10, p. 1793-803, Oct 2005.

WU, L.; VAN KAER, L. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr Mol Med* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 4-14, Feb 2009.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* [S.I.], v. 214, n. 2, p. 199-210, Jan 2008.

YAMAGIWA, S. *et al.* Sustained response to interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells. *Hepatol Res* [S.I.], v. 38, n. 7, p. 664-72, Jul 2008.

YANG, L.; MOSMANN, T. Synthesis of several chemokines but few cytokines by primed uncommitted precursor CD4 T cells suggests that these cells recruit other immune cells without exerting direct effector functions. *Eur J Immunol* [S.I.], v. 34, n. 6, p. 1617-26, Jun 2004.

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

YU, K. O.; PORCELLI, S. A. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunol Lett* [S.I.], v. 100, n. 1, p. 42-55, Aug 15 2005.

YUAN, Q. *et al.* CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* [S.I.], v. 204, n. 6, p. 1327-34, Jun 11 2007.

YULING, H. *et al.* EBV-induced human CD8+ NKT cells suppress tumorigenesis by EBV-associated malignancies. *Cancer Res* [S.I.], v. 69, n. 20, p. 7935-44, Oct 15 2009.

ZHOU, D. *et al.* Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* [S.I.], v. 306, n. 5702, p. 1786-9, Dec 3 2004.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 121-7, Feb 2000.

## **VIII. ANEXOS**

# **ANEXO I**

**Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of  
experimental dengue infection in mice**

*PLoS One (Under review)*

1 **Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the**  
2 **pathogenesis of experimental dengue infection in mice**

3

4 Rodrigo Guabiraba<sup>1,2</sup>, Rafael Elias Marques<sup>1</sup>, Anne-Gaëlle Besnard<sup>2</sup>, Caio T. Fagundes<sup>1</sup>,  
5 Danielle G. Souza<sup>3</sup>, Bernhard Ryffel<sup>2</sup>, Mauro M. Teixeira<sup>1\*</sup>

6

7 1 Immunopharmacology, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas,  
8 Universidade Federal de Minas Gerais. 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

9 2 Université d'Orléans and CNRS, UMR 6218, Molecular Immunology and Embryology. 45071.  
10 Orléans, France.

11 3 Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas  
12 Gerais. 31270-901. Belo Horizonte, MG, Brazil.

13

14

15 **\*Corresponding author:**

16 Dr. Mauro Martins Teixeira, MD, PhD

17 Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de  
18 Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627 – Pampulha. 31270-901 BELO HORIZONTE-MG, BRAZIL.

19 Phone/Fax # 55 31 3409 2651

20 e-mail: mmtex@icb.ufmg.br

21

22 **Running head:** CC chemokine receptors and dengue infection

23

24

25

26

27 **Abstract**

28 *Dengue virus* (DENV), a mosquito-borne flavivirus, is a public health problem in many  
29 tropical countries. Recent clinical data have shown an association between levels of different  
30 chemokines in plasma and severity of dengue. We evaluated the role of CC chemokine  
31 receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in an experimental model of DENV-2 infection in mice.  
32 Infection of mice induced evident clinical disease and tissue damage, including  
33 thrombocytopenia, hemoconcentration, increased levels of transaminases and pro-  
34 inflammatory cytokines, and lethality in WT mice. Importantly, infected WT mice presented  
35 increased levels of chemokines CCL2/JE, CCL3/MIP-1 $\alpha$  and CCL5/RANTES in spleen and  
36 liver. CCR1<sup>-/-</sup> mice had a mild phenotype with disease presentation and lethality similar to  
37 those of WT mice. In CCR2<sup>-/-</sup> mice, lethality, liver damage, levels of IL-6 and IFN- $\gamma$ , and  
38 leukocyte activation were attenuated. However, thrombocytopenia, hemoconcentration and  
39 systemic TNF- $\alpha$  levels were similar to infected WT mice. Infection enhanced levels of  
40 CCL17/TARC, a CCR4 ligand. In CCR4<sup>-/-</sup> mice, lethality, tissue injury and systemic  
41 inflammation were markedly decreased. Despite differences in disease presentation in CCR-  
42 deficient mice, there was no significant difference in viral load. In conclusion, activation of  
43 chemokine receptors has discrete roles in the pathogenesis of dengue infection. These studies  
44 suggest that the chemokine storm that follows severe primary dengue infection associates  
45 mostly to development of disease rather than protection.

46

47

48

## 49 **Introduction**

50 Dengue fever (DF) and its severe forms, dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue  
51 shock syndrome (DSS), are mosquito-borne diseases caused by one of four serotypes of  
52 *Dengue virus* (DENV 1-4) [1,2,3]. DENV is a single-stranded RNA virus that belongs to the  
53 Flaviviridae family and is transmitted to humans mainly by *Aedes* mosquitoes [1,4]. They  
54 constitute a serious public health problem in tropical and subtropical areas, where the  
55 incidence, distribution and clinical severity of dengue cases have dramatically increased in the  
56 last 60 years [4]. Treatment of DF or DHF/DSS is largely supportive and the lack of clinical  
57 or laboratory markers for an efficient diagnostic associated to the lack of a vaccine or specific  
58 treatment put a serious burden on health systems of low income countries [1,4,5].

59 The pathogenesis of DENV remains poorly understood and involves a complex  
60 interplay of viral and host factors, including viral serotype [6,7], genotype [6], and the genetic  
61 background of the host [8,9]. Secondary infection by a heterologous serotype has been shown  
62 to be the single greatest risk factor for DHF/DSS in human subjects [9,10,11,12] although  
63 severe disease in primary infections is also reported [6,13,14,15].

64 DHF/DSS is characterized by hemorrhagic manifestations, thrombocytopenia and  
65 hemoconcentration [1,4,7], where the dysfunction of vascular endothelial cells that leads to  
66 plasma leakage is mediated by host immune response [5,12,13]. DENV can interact with  
67 immune cells such as dendritic cells (DCs), monocytes/macrophages, hepatocytes and  
68 endothelial cells [7,16,17,18,19,20], resulting in the production of immune mediators that  
69 shape innate and acquired immune responses. High levels of pro-inflammatory cytokines and  
70 chemokines, including TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, CCL2/MCP-1 and IFN- $\gamma$ , have been reported in  
71 patients with severe dengue disease [2,21,22,23]. However, it is not clearly understood how  
72 this massive cytokine production is induced and eventually controlled, a phenomenon that  
73 also occurs in bacterial sepsis and other shock related syndromes [24,25].



74 Chemokines are members of a structurally related family of cytokines involved in  
75 leukocyte traffic during inflammation. They are classified according to the relative position of  
76 conserved N-terminal cysteine residues, in which CC chemokines represent the most  
77 abundant family and have the first 2 cysteines placed adjacently [26,27]. Chemokine receptors  
78 are expressed on the surface of leukocytes and are G protein-coupled receptors containing 7  
79 transmembrane domains [26,28,29]. They may also contribute to angiogenesis, recruitment  
80 and transmigration of leukocytes, vascular and tissue remodeling, chronification of  
81 inflammation, among others [27,28,30,31,32]. Experimental and epidemiological evidences  
82 suggest an important role for chemokines, especially those from the CC family, and their  
83 receptors in infectious diseases such as HIV, HSV-1 and other viral infections  
84 [27,33,34,35,36].

85 Recent clinical studies in endemic areas describe a correlation between dengue disease  
86 outcome and levels of CC chemokines, including CCL4/MIP1- $\beta$  and CCL3/MIP1- $\alpha$ , both  
87 ligands for the CCR1 receptor, and for CCL2/MCP-1, the ligand for CCR2 [37,38,39]. A link  
88 between CCL5/RANTES, a CCR1/CCR5 ligand, and hepatic dysfunction had already been  
89 shown [40,41]. In addition, CCL2/MCP-1 and IL-8 are intimately related to hypotension,  
90 thrombocytopenia and hemorrhagic shock [21,22,37,41,42]. However, the relevance of  
91 chemokines for the pathogenesis and host response in the context of dengue infection remains  
92 to be determined.

93 We have recently developed a model of dengue infection in mice that resembles many  
94 of the features of severe dengue infection in humans, including thrombocytopenia, increased  
95 vascular permeability, cytokine storm, systemic inflammation and death [43,44,45]. Using  
96 this model, we have investigated the role of CC chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4  
97 during experimental DENV infection. Ligands to these receptors have been shown to be  
98 elevated in human and experimental dengue infection [21,37,38,39,40,41,46,47].

## 99 **Material and Methods**

### 100 **Ethics statement**

101 All experimental procedures were approved and complied with the French government's  
102 ethical and animal experiment regulations and the Comité National de Réflexion Ethique sur  
103 l'Expérimentation Animale, CNRS, Orléans, France (CLE CCO 2009-013).

104

### 105 **Mice**

106 Eight to ten week-old male wild type (WT) C57BL/6 (H-2D<sup>b</sup>) mice were purchased from  
107 Janvier (Le Genest-St-Isle, France). CCR1<sup>-/-</sup>, CCR2<sup>-/-</sup> and CCR4<sup>-/-</sup> male mice, eight to ten  
108 week-old, backcrossed at least 10 times in C57BL/6, were bred in the animal facility of the  
109 Transgenose Institute (CNRS, Orléans, France). All animals were kept under controlled  
110 temperature (23°C) with a strict 12 h light/dark cycle, autoclaved food and water available *ad*  
111 *libitum* under SPF (specific pathogen-free conditions).

112

### 113 **Virus**

114 The mouse-adapted DENV serotype 2 strain (DENV-2) P23085 was obtained from the State  
115 Collection of Viruses, Moscow, Russia, and adapted as previously described [44]. Sequence  
116 of portions of E and NS1 genes of the adapted virus was deposited previously at GenBank  
117 under the accession number AY927231. Virus adaptation was performed in a maximum  
118 containment biosafety level-3 (BSL-3) of the SRC VB "Vector", Koltsovo, Russia. For the  
119 current set of experiments, the last 2 passages of the mouse-adopted DENV-2 strain was  
120 performed in LLC-MK2 cells (Kidney, Rhesus monkey, ATCC) to produce stocks which  
121 were stored in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) at -80°C. To  
122 calculate virus titers in LLC MK2 cells supernatants, expressed as LD<sub>50</sub>, groups of ten mice  
123 were inoculated i.p. with serial dilutions of the virus and lethality recorded. The titer of our

124 DENV-2 stock was  $10^5$  LD<sub>50</sub>/ml or  $2 \times 10^6$  PFU/ml of LLC MK2 supernatant, as calculated in  
125 8-10-week-old BALB/c mice, a more susceptible lineage [48].

126

### 127 **Infection and experimental design**

128 For DENV infection, mice were handled and kept in a biosafety level 3 (BSL-3) in the animal  
129 facility of the Transgenose Institute (CNRS, Orléans, France). For the evaluation of lethality  
130 and inflammation, mice were inoculated i.p. with DENV-2 virus (10 LD<sub>50</sub>) diluted in 100 µl  
131 of endotoxin-free DPBS (Gibco). One LD<sub>50</sub> corresponds to the inoculum necessary to kill  
132 50% of 4 weeks old BALB/c mice and correspond to approximately 20 PFU, as assessed in  
133 LLC-MK2 cells. Lethality rates and body weight loss were evaluated every 12 h until day 14  
134 post infection (p.i.). The other parameters were evaluated at day 6 after i.p. inoculation of the  
135 virus, a time point where animals were still alive and showed significant clinical signs of  
136 disease. In all experiments using genetically deficient mice (KO mice), experiments with the  
137 relevant WT controls were performed in parallel. Viral stocks were prepared in LLC MK2  
138 cells and non-infected animals were inoculated with DMEM supernatants from non-infected  
139 LLC MK2 cells diluted in a similar manner. At day 6 p.i., mice were anesthetized i.p. with a  
140 ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg) solution diluted in sterile DPBS and blood were  
141 recovered for serum preparation and hematological analysis. Then, mice were killed by  
142 cervical displacement and spleen and liver samples were recovered for cytokine dosage,  
143 FACS analysis and/or viral titration. Samples were stocked at -80°C prior to the analysis.  
144 Liver samples were also used for histological analysis.

145

### 146 **Titration of virus**

147 Mice were assayed for viral titers in the liver, as previously described [43,45]. Briefly, tissue  
148 samples were prepared as 10% (w/v) homogenates in DMEM without fetal bovine serum (FBS).

149 Viral load in the supernatants of tissue homogenates was assessed by direct plaque assays using  
150 LLC-MK2 cells. Samples of organ homogenates were diluted serially and placed in duplicate  
151 into 6-wells plates (TPP, Techno Plastic Products AG) of LLC-MK2 cell monolayers and  
152 incubated for 1 h. An overlay solution containing 199 medium (Gibco) with Earle's salts, L-  
153 glutamine and 3% FBS in 1,5% CMC (Carboxymethylcellulose, Sigma) was added to each well  
154 and the cultures were incubated for 9 days. Cultures were stained with crystal violet for  
155 enumeration of viral plaques. The results were measured as plaque forming units (PFU) per 100  
156 mg of tissue weight. The limit of detection of the assay was 10 PFU/100 mg of tissue.

157

#### 158 **Evaluation of blood parameters**

159 Blood was obtained from the brachial plexus of anesthetized mice in heparin-containing  
160 syringes, at the indicated times, and stocked in heparinized tubes prior to analysis. The final  
161 concentration of heparin was 50 U/ml. Platelets and hematocrit were evaluated in a Coulter  
162 Counter (S-Plus Jr, Beckman Coulter). Results are presented as percentage of hematocrit and  
163 platelets per  $\mu\text{l}$  of blood.

164

#### 165 **AST and ALT dosage**

166 Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT) were dosed in non-  
167 hemolyzed serum samples as marker enzymes associated to hepatic damage due to DENV-2  
168 infection. The colorimetric assays to evaluate the aforementioned enzymes were conducted  
169 following the manufacturer's protocol (Quibasa, Bioclin, Brazil).

170

#### 171 **Determination of Myeloperoxidase (MPO) activity**

172 For MPO analysis, as an indirect index of neutrophil accumulation, spleen and liver  
173 homogenates were prepared in 1 ml of PBS containing 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium

174 bromide (HTAB) and 5 mM EDTA using a Dispomix tissue homogenizer (Medic Tools) and  
175 the protocol was followed as already described [49]. Results are expressed as arbitrary units  
176 (OD 492 nm) and were corrected for the activity of other peroxidases, which were not  
177 inhibited by 3-amino-1,2,4-triazole.

178

### 179 **Quantification of cytokines and chemokines concentrations**

180 The concentrations of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, CCL17/TARC, CCL2/JE, CCL3/MIP-1 $\alpha$  and  
181 CCL5/RANTES in serum or tissue samples were measured by ELISA using commercially  
182 available antibodies and according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D  
183 Systems, Minneapolis). ELISA measurements for a given experiment were conducted in the  
184 same plate. Results are expressed as pg/ml or pg per 100 mg of tissue. The detection limit of  
185 the ELISA assays was in the range of 4-8 pg/ml.

186

### 187 **Histopathology**

188 A portion of liver was obtained from mice at day 6, immediately fixed in 4% buffered  
189 formalin and tissues fragments were embedded in paraffin. Tissue sections (4  $\mu$ m thick) were  
190 stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined under light microscopy. Pictures  
191 were taken using the QCapture Pro 6.0 software (QImaging, Canada).

192

### 193 **Flow cytometry**

194 Spleens were collected, homogenized in sterile strainers and resuspended in PBS 2% FBS.  
195 Red blood cells were removed with lysis buffer (Sigma-Aldrich). Cells were stained for  
196 extracellular molecular expression patterns using monoclonal antibodies (mAb) against  
197 mouse CD3 (PerCP-Cy5-conjugated), DX5 (FITC-conjugated), CD4 (Pacific Blue-  
198 conjugated), CD8 (APC-Cy7-conjugated), F4/80 (PE-conjugated) CD69 (PE-conjugated),

199 CD11b (PerCp-Cy5.5-conjugated), Ly6G (PE-Cy7-conjugated), CD86 (APC-conjugated) and  
200 isotype controls. All antibodies were purchased from BD Pharmingen (Le Pont de Claix,  
201 France). In all cases,  $5 \times 10^5$  to  $1 \times 10^6$  gated events were acquired for later analysis. The  
202 frequency of positive cells was analyzed using a gate that included lymphocytes, granulocytes  
203 and monocytes/macrophages. Limits for the quadrant markers were always set based on  
204 negative populations and isotype controls. Cells were acquired on a BD FACSCanto II (BD  
205 Biosciences) cytometer and analyzed using the FlowJo 7.5.3 software (TreeStar Inc.).  
206 Analysis in FlowJo software took into account size and granularity of populations. Frequency  
207 in number of an analyzed population in front of total acquired events was used in the  
208 construction of graphs.

209

#### 210 **Statistical analysis**

211 Results are shown as means  $\pm$  S.E.M. Differences were compared by using analysis of  
212 variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls post-hoc analysis. Differences  
213 between lethality curves were calculated using Log rank test (Graph Prism Software 4.0).  
214 Results with a  $P < 0.05$  were considered significant. All data are representative of at least 2  
215 experiments.

216

217

218

219

220

221

222

## 223 **Results**

### 224 *Lethality rate after DENV-2 infection in mice*

225 Mice infected with a mouse-adapted DENV-2 strain have a clinical presentation that  
226 resembles DHF/DSS in humans, including thrombocytopenia and increased vascular  
227 permeability that eventually leads to shock and death [43,44,45]. As seen in Figure 1A,  
228 infection of WT mice with an inoculum of 10 LD<sub>50</sub> killed approximately 80% of mice  
229 around days 6 to 8 after inoculation. Lethality rate in CCR1<sup>-/-</sup> mice was similar to that of WT  
230 mice. In contrast, there was significant protection of infected CCR2<sup>-/-</sup> and CCR4<sup>-/-</sup> mice  
231 (P=0,0312 and P=0,0091, respectively). Indeed, 60% of animals were still alive till day 14  
232 after inoculation. Infection of WT mice was associated with rapid weight loss starting at day 4  
233 p.i. and leading to loss of about 5% at day 7 for surviving animals. Of notice, CCR1<sup>-/-</sup> mice  
234 lost weight in a manner similar to that of WT animals and weight loss was significantly  
235 decreased in CCR2<sup>-/-</sup> and CCR4<sup>-/-</sup> mice at about 3% (data not shown).

236

### 237 *Hematological parameters and viral load*

238 Thrombocytopenia is a common finding in patients with dengue fever and DHF/DSS,  
239 but does not appear to correlate with disease severity or outcome [1,7]. Thrombocytopenia is  
240 first observed at day 3 and peak at days 6-7 after infection [6,37,50]. In the present study,  
241 platelet levels were evaluated at day 6 p.i, a time point at which levels were lowest and the  
242 percentage of surviving animals maximal. Platelet number in infected WT mice was about  
243 30% of non-infected animals (Figure 1B). There was a similar fall in platelet number in both  
244 CCR1<sup>-/-</sup> and CCR2<sup>-/-</sup> infected mice. The decrease of platelet numbers in CCR4<sup>-/-</sup> mice was  
245 slightly less than in WT mice (Figure 1B).

246 Plasma leakage and consequent hemoconcentration is a relatively late event and a  
247 major finding in patients with severe dengue [21,50,51,52,53]. Infection of WT mice induced

248 significant increase in hemoconcentration (Figure 1C). Similar increase was observed in  
249 infected CCR1<sup>-/-</sup> and CCR2<sup>-/-</sup> deficient mice. Hemoconcentration occurred but was of lower  
250 magnitude in infected CCR4<sup>-/-</sup> mice than in their WT controls (Figure 1C).

251 Despite differences observed in lethality and hematology, there were no significant  
252 differences in viral titers in liver of WT and CCR1, CCR2 and CCR4 KO mice (Figure 1D).

253

### 254 *Liver inflammation and injury*

255 The liver is a major target organ in severe cases of dengue infection [7,16,41].  
256 Infection of mice with DENV-2 resulted in significant increase in serum levels of the  
257 transaminases AST and ALT at day 6 (Figure 2A and B). Granulocytes often become  
258 activated, accumulate in tissues and may contribute to organ damage in the context of DENV  
259 infection [54]. There was significant accumulation of neutrophils in the liver (Figure 2C) and  
260 spleen (data not shown) of infected WT mice, as assessed by tissue levels of MPO. The  
261 changes above were accompanied by an increase in liver concentration of IL-6 and IFN- $\gamma$   
262 (Figure 2D and E). Liver sections of infected WT revealed signs of congestion, haemorrhage,  
263 hepatocyte degeneration and necrosis (Figure 3).

264 Overall, CCR1<sup>-/-</sup> mice had similar degree of damage as WT mice, with only slightly  
265 enhanced MPO activity and levels of both IL-6 and IFN- $\gamma$  in liver (Figure 2). MPO levels  
266 were also slightly increased in liver of CCR2<sup>-/-</sup> mice, but there was decreased liver injury, as  
267 seen by decreased levels of transaminases in serum and by histology. Decreased liver damage  
268 was associated with decreased local production of both IL-6 and IFN- $\gamma$  (Figure 2). Systemic  
269 levels of transaminases and local levels of MPO and cytokines were significantly decreased in  
270 infected CCR4<sup>-/-</sup> mice, a finding consistent with the amelioration of liver damage as  
271 demonstrated in tissues sections (Figure 3).



272 Levels of the chemokines CCL2/JE, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES and  
273 CCL17/TARC were evaluated in liver samples of infected WT and chemokine receptor-  
274 deficient mice. With the exception of CCL17, which did not rise above basal levels in the  
275 liver (data not shown), there was significant increase of CCL2, CCL3 and CCL5 after DENV-  
276 2 infection (Figure 4A-C). In infected CCR1<sup>-/-</sup> mice, levels of CCL3 increased slightly above  
277 levels found in WT mice. CCR2<sup>-/-</sup> mice showed slightly enhanced levels of CCL2 and CCL5,  
278 a finding consistent with the enhanced MPO levels observed in these mice. Levels of CCL2  
279 and CCL5 were decreased in liver samples of CCR4<sup>-/-</sup> mice (Figure 4A and C). There were no  
280 differences in basal levels of cytokines/chemokines between both non-infected WT and KO  
281 mice (data not shown).

282

### 283 *Systemic cytokine and chemokine response*

284 Previous studies have shown that IL-6 and IFN- $\gamma$  are elevated systemically in patients  
285 with dengue or in experimental models of the infection [37,41,44,47,55,56,57]. Indeed, very  
286 large concentrations of both IL-6 and IFN- $\gamma$  were detectable in serum of DENV-2-infected  
287 WT mice (Figure 5A and B). In CCR1<sup>-/-</sup> mice, concentration of IFN- $\gamma$  was similar to WT mice  
288 and there was an increase in serum levels of IL-6. Levels of both cytokines were decreased in  
289 serum samples of CCR2<sup>-/-</sup> and CCR4<sup>-/-</sup> mice, as compared to infected WT mice (Figure 5).

290 Levels of TNF- $\alpha$  and chemokines were measured in spleen homogenates to get a  
291 glimpse of the systemic inflammatory response to dengue infection and because available  
292 serum samples were used for transaminases and IL-6/ IFN- $\gamma$  determinations. As seen in  
293 Figure 6A, levels of TNF- $\alpha$  were significantly enhanced after infection of WT mice.  
294 Similarly, there was marked increase in levels of CCL2, CCL3, CCL5 and CCL17 in spleen  
295 homogenates of infected WT mice (Figure 6B-E). Levels of all chemokines and TNF- $\alpha$  were  
296 decreased in infected CCR4<sup>-/-</sup> mice when compared to WT mice, with the exception of

297 CCL17 (Figure 6E). Indeed, the levels of CCL17, which binds to CCR4, were greatly  
298 enhanced in CCR4<sup>-/-</sup> mice. Levels of TNF- $\alpha$  were similar in infected CCR1<sup>-/-</sup> and CCR2<sup>-/-</sup>  
299 mice when compared to WT mice. Levels of CCL3 are enhanced in CCR1<sup>-/-</sup> mice and levels  
300 of CCL2 and CCL5 in spleen homogenates of infected CCR2<sup>-/-</sup> mice (Figure 6). There were  
301 no differences in basal levels of cytokines/chemokines between both non-infected WT and  
302 KO mice (data not shown).

303

#### 304 *Number and activation of leukocytes in spleen*

305 Next, we evaluated the number of leukocytes in spleen of WT and chemokine receptor  
306 deficient mice in the course of dengue infection. Overall, DENV-2 infection caused  
307 significant reduction in the total number of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and NKT cells  
308 (CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup>) in the spleen of infected when compared to non-infected WT mice (Figure 7A,  
309 C and E). Despite reduction in total cell numbers, activated CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T and NKT cells, as  
310 determined by CD69 expression, were more abundant in spleen of infected mice (Figure 7B,  
311 D and F). Similar findings were observed in CCR1<sup>-/-</sup> mice; ie. decreased number of cells but  
312 available cells were more activated (Figure 7). In contrast, absence of CCR2 or CCR4  
313 partially reversed the phenotype observed in WT mice. Indeed, there was a lesser decrease in  
314 total CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T and NKT number and cells tended to be less activated (Figure 7).

315 In contrast to the CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T and NKT lymphopenia, DENV-2 infection caused  
316 significant increase in the number of NK cells (CD3<sup>-</sup>DX5<sup>+</sup>), macrophages (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>)  
317 and neutrophils (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) (Figure 8A-C). Again, infected CCR1<sup>-/-</sup> mice were similar to  
318 infected WT mice, with the exception of an increase in number of neutrophils in spleen.  
319 CCR2<sup>-/-</sup> mice had only mild changes in comparison to their WT controls, whereas CCR4<sup>-/-</sup>  
320 mice had decreased accumulation of all 3 cell types in spleen (Figure 8).

321

## 322 **Discussion**

323 In the present work we have investigated the putative role of CC chemokine receptors  
324 CCR1, CCR2 and CCR4 in the context of experimental *Dengue virus* infection. Our major  
325 findings can be summarized as follows: 1) CCR1 does not seem to have a major role in the  
326 pathogenesis of severe experimental dengue infection; 2) CCR2 appeared to contribute to  
327 dengue-associated liver damage and this was reflected on decreased leukocyte activation and  
328 decreased lethality. However, there was no major difference in the systemic inflammatory  
329 response associated with infection; 3) CCR4 also contributed to the pathogenesis of  
330 experimental dengue infection and was relevant for virus-induced liver damage and associated  
331 systemic inflammation. This was reflected on the decreased leukocyte activation and  
332 decreased lethality.

333 CCR1 receptors are widely expressed in monocytic and non-monocytic populations  
334 [29,30,31]. CCR1 ligands, such as CCL3/MIP-1 $\alpha$  and CCL4/ MIP-1 $\beta$ , are found in elevated  
335 concentrations in plasma of patients with DENV infection and may associated with disease  
336 severity [37,38,39]. Consistently with the latter finding, levels of CCL3/MIP-1 $\alpha$  are increased  
337 in spleen and liver of infected mice. However, we found that the course of infection in CCR1<sup>-</sup>  
338 <sup>-</sup> was similar to that in WT mice. Levels of CCL3 were greater in spleen and liver of infected  
339 CCR1<sup>-</sup> than infected WT animals. This is in agreement with the idea that chemokine  
340 receptors work as important negative modulators or scavengers of their own ligands and  
341 lower their levels in tissues [58]. In that respect, elevated levels of CCL3 could then activate  
342 the other CCL3 receptor, CCR5. We have not investigated here the role of CCR5 to infection  
343 outcome but it is clear that CCR1<sup>-</sup> mice had no major phenotype when infected with an  
344 innoculum which causes severe disease in mice. Therefore, CCR1 does not appear to play a  
345 major role in the pathogenesis of severe experimental dengue infection.

346 CCL2/MCP-1 is produced under many inflammatory conditions and exerts its  
347 functions mainly through the CCR2 receptor, which is expressed in monocytes, macrophages  
348 and also neutrophils [25,27,31,59]. Levels of CCL2 have been positively associated with  
349 worse prognosis in DENV-infected subjects [21,37]. In our experiments, survival rates were  
350 reduced in CCR2<sup>-/-</sup> mice and this was associated to decreased levels of serum transaminases  
351 and reduced liver inflammation and damage. Of interest, hepatocytes are common targets of  
352 DENV and can actively respond to the infection by producing cytokines and chemokines [41].  
353 The degree of thrombocytopenia and hemoconcentration was similar in WT and CCR2<sup>-/-</sup>  
354 mice, but levels of IL-6 and IFN- $\gamma$ , but not TNF- $\alpha$ , were decreased systemically in infected  
355 CCR2<sup>-/-</sup> mice. There was also decreased activation of major cell types involved in DENV  
356 infection, including CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NKT cells and macrophages. Interestingly, preliminary  
357 data from our group shows that NKT cells contribute to the “cytokine storm” associated with  
358 DENV infection in mice (Renneson *et al*, 2010, unpublished data). Therefore, decreased  
359 leukocyte activation in infected CCR2<sup>-/-</sup> mice may explain the decreased cytokine storm and  
360 decreased tissue damage observed in these animals. Increased plasma extravasation is thought  
361 to lead to hemoconcentration, hypotension and death [21,50,51,52,53]. It is, therefore, not  
362 clear why there is still significant hemoconcentration in CCR2<sup>-/-</sup> mice at day 6 after infection,  
363 despite decreased cytokine levels, liver damage and lethality rates. It is possible that a few  
364 animals may eventually recover from the massive vascular permeability which leads to  
365 hemoconcentration because they have more adequate liver function. Experimentally, these are  
366 difficult experiments to perform because control animals are mostly dead at later stages of  
367 infection and there would be few control animals with which to compare the CCR2<sup>-/-</sup> mice.  
368 Surviving CCR2<sup>-/-</sup> mice have normal blood parameters at later stages (day 14) of infection  
369 (data not shown). Thus, CCR2 plays a role in the pathogenesis of severe experimental dengue

370 infection and it appears that enhanced survival in CCR2<sup>-/-</sup> mice is probably secondary to  
371 decreased liver damage, decreased cell activation and decreased cytokine storm.

372 The CCR4 receptor is expressed on T cells, especially Th2-type lymphocytes, and may  
373 contribute to the pathogenesis of severe conditions, including asthma [60,61,62,63,64,65].  
374 Interestingly, CCR4 deficiency results in attenuated severity of murine polymicrobial sepsis  
375 and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock, implicating this receptor in the pathogenesis  
376 of acute conditions [66,67]. Other experiments, however, have found a protective role for  
377 CCL22/MDC, a CCR4 ligand, in a cecal ligation and puncture (CLP) model of sepsis in mice  
378 [68]. In preliminary experiments, we found that CCL17/TARC, one of the ligands for CCR4,  
379 was detectable at high levels in spleen of infected mice. More importantly, experiments in  
380 CCR4<sup>-/-</sup> showed that these animals were protected from DENV-associated disease. Indeed,  
381 there was decreased hemoconcentration, thrombocytopenia, liver damage, systemic  
382 inflammation and leukocyte activation in CCR4<sup>-/-</sup> mice. This resulted in significant protection  
383 from lethality. These results imply a crucial role of this receptor in the pathogenesis of  
384 DENV-associated severe disease. Importantly, viral load was not altered in CCR4<sup>-/-</sup> when  
385 compared to WT animals. These results suggest that CCR4 does not play a major role in the  
386 control of viral entry and replication, but contribute mostly to the cascade of events that lead  
387 to tissue and systemic damage. In this respect, our findings are consistent with the protective  
388 role of CCR4 in the pathogenesis of bacterial sepsis [66,67]. It is difficult to suggest the  
389 mechanism by which CCR4 may contribute to the pathogenesis of dengue. However, CCR4  
390 may be important for the trafficking and activation of NKT cells and naive CD8<sup>+</sup> cells by at  
391 least two independent chemokine pathways, including CCL17/TARC and CCL22 [69,70]. In  
392 addition, excessive NKT activation contributes to the pathogenesis of severe disease in our  
393 model (Renneson *et al*, 2010, unpublished data). Thus, at least in viral (present study) and  
394 polymicrobial sepsis, blockade of CCR4 may be beneficial from the therapeutic point of view,

395 a tenet that must be tested further in patients. Indeed, we are unaware of studies  
396 demonstrating the putative role of CCR4 ligands, such as CCL17 and CCL22, in the context  
397 of DENV infection in humans.

398 In conclusion, CCR1, CCR2 and CCR4 play discrete roles in the pathogenesis of  
399 disease in a model of DENV in mice. In contrast, these receptors appear not to play an  
400 essential role in protection against primary infection. Our studies suggest that the chemokine  
401 storm that follows severe primary dengue infection associates mostly to development of  
402 disease rather than protection. It is, therefore, possible that blockade of the chemokine system  
403 may be beneficial as co-adjuvant treatment for severe dengue infection.

404

#### 405 **Acknowledgements**

406 We acknowledge I. Maillet and M. Fauconnier for their technical assistance (CNRS UMR  
407 6218, Orléans, France) and Dr. R.C. Russo (UFMG) for his helpful discussions.

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420 **Figure 1. Lethality rate, hematological alterations and viral load upon DENV-2**  
421 **infection.** WT or CCR1<sup>-/-</sup>, CCR2<sup>-/-</sup> and CCR4<sup>-/-</sup> (KO) mice were infected i.p. with 10 LD<sub>50</sub>  
422 of DENV-2 and then monitored for lethality until day 14. In panel A, percentages of survival  
423 (n = 10-12). Hematological analysis were done at day 6 p.i. for changes in platelets count (B)  
424 and hematocrit (C) in the blood of non-infected and infected-WT and KO mice. In panel D,  
425 viral loads recovered from the liver of WT and KO mice at day 6 p.i. shown as the log of  
426 PFU/100 mg of tissue. Results are expressed as mean ± SEM and are representative of at least  
427 two experiments. \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 when compared to non-infected mice. # P < 0.05,  
428 ## P < 0.01 when compared to WT infected mice. NI: non-infected mice.

429

430 **Figure 2. Liver inflammation and injury upon DENV-2 infection.** WT or KO mice were  
431 infected i.p. with 10 LD<sub>50</sub> of DENV-2 and then sacrificed at day 6 for blood and tissue  
432 samples. AST (A) and ALT (B) were dosed in serum of WT and KO mice as markers of  
433 hepatic injury. MPO activity, as an index of neutrophil accumulation, was evaluated in liver  
434 (C). Concentrations of cytokines IL-6 (D) and IFN-γ (E) were evaluated in liver homogenates  
435 by ELISA and are expressed as pg per 100 mg of tissue. Results are expressed as mean ±  
436 SEM and are representative of at least two experiments (n = 5-6). \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001  
437 when compared to non-infected mice. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 when compared  
438 to WT infected mice. NI: non-infected mice.

439

440 **Figure 3. Histological changes in liver upon DENV-2 infection in mice.** WT or KO mice  
441 were infected i.p. with 10 LD<sub>50</sub> of DENV-2 and then sacrificed at day 6 for tissue samples.  
442 Hematoxylin & Eosin stained liver sections from non-infected and DENV-2 infected WT,  
443 CCR1<sup>-/-</sup>, CCR2<sup>-/-</sup> and CCR4<sup>-/-</sup> mice, showing different degrees of congestion, hemorrhage,

444 hepatocyte degeneration and necrosis. Each slide presented in the panel is representative of at  
445 least 10 different fields. Magnification: 400X.

446

447 **Figure 4. Chemokines production in liver upon DENV-2 infection in mice.** WT or KO  
448 mice were infected i.p. with 10LD<sub>50</sub> of DENV-2 and then sacrificed at day 6 for tissue  
449 samples. CCL2/JE (A), CCL3/MIP-1 $\alpha$  (B) and CCL5/RANTES (C) were evaluated in liver  
450 homogenates by ELISA and are expressed as pg per 100 mg of tissue. Results are expressed  
451 as mean  $\pm$  SEM and are representative of at least two experiments (n = 5-6). \*P < 0.05, \*\*\* P  
452 < 0.001 when compared to non-infected mice. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 when  
453 compared to WT infected mice. NI: non-infected mice.

454

455 **Figure 5. Cytokine production in serum upon DENV-2 infection in mice.** WT or KO mice  
456 were infected i.p. with 10 LD<sub>50</sub> of DENV-2 and then sacrificed at day 6 for blood samples.  
457 IL-6 (A) and IFN- $\gamma$  (B) were evaluated in serum by ELISA and are expressed as pg/ml.  
458 Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and are representative of at least two experiments (n =  
459 5-6). \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 when compared to non-infected mice. # P < 0.05, ## P <  
460 0.01, ### P < 0.001 when compared to WT infected mice. NI: non-infected mice.

461

462 **Figure 6. Cytokine and chemokine production in spleen upon DENV-2 infection in mice.**  
463 WT or KO mice were infected i.p. with 10 LD<sub>50</sub> of DENV-2 and then sacrificed at day 6 for  
464 tissue samples. TNF- $\alpha$  (A), CCL2/JE (B), CCL3/MIP-1 $\alpha$  (C), CCL5/RANTES (D) and  
465 CCL17/TARC (E) were evaluated in spleen homogenates by ELISA and are expressed as pg  
466 per 100 mg of tissue. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM and are representative of at least  
467 two experiments (n = 5-6). \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 when compared to non-infected mice. #



468 P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 when compared to WT infected mice. NI: non-infected  
469 mice.

470

471 **Figure 7. Lymphocyte number and activation in CC chemokine receptors deficient mice**  
472 **upon DENV-2 infection.** WT or KO mice were infected i.p. with 10 LD<sub>50</sub> of DENV-2 and  
473 then sacrificed at day 6. Splenic leukocytes were stained with specific antibodies. Flow  
474 cytometry, according to size and granularity, were performed as analysis. The numbers of  
475 specific cell populations are shown as compared to total number of leukocytes. Number of T  
476 lymphocytes CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A) and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (C) were evaluated in WT and KO mice.  
477 Activated T lymphocytes expressing CD69 were also evaluated for CD4<sup>+</sup> (B) and CD8<sup>+</sup> (D)  
478 populations. The number of CD3<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup> NKT cells (E) and their activation by CD69  
479 expression as MFI, were also evaluated (F). Results are expressed as mean ± SEM and are  
480 representative of at least two experiments (n = 5-6). \*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001  
481 when compared to non-infected mice. # P < 0.05, ## P < 0.01 when compared to WT infected  
482 mice. NI: non-infected mice. MFI: Mean fluorescence intensity.

483

484 **Figure 8. NK, macrophages and neutrophils in CC chemokine receptors deficient mice**  
485 **upon DENV-2 infection.** WT or KO mice were infected i.p. with 10 LD<sub>50</sub> of DENV-2 and  
486 then sacrificed at day 6. Splenic leukocytes were stained with specific antibodies. Flow  
487 cytometry, according to size and granularity, were performed as analysis. The numbers of  
488 specific cell populations are shown as compared to total number of leukocytes. Numbers of  
489 CD3<sup>-</sup>DX5<sup>+</sup> NK cells (A), macrophages CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> (B) and infiltrating neutrophils  
490 CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> (C) were evaluated. Results are expressed as mean ± SEM and are  
491 representative of at least two experiments (n = 5-6). \*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001

492 when compared to non-infected mice. # P < 0.05, ## P < 0.01 when compared to WT infected  
493 mice. NI: non-infected mice.

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

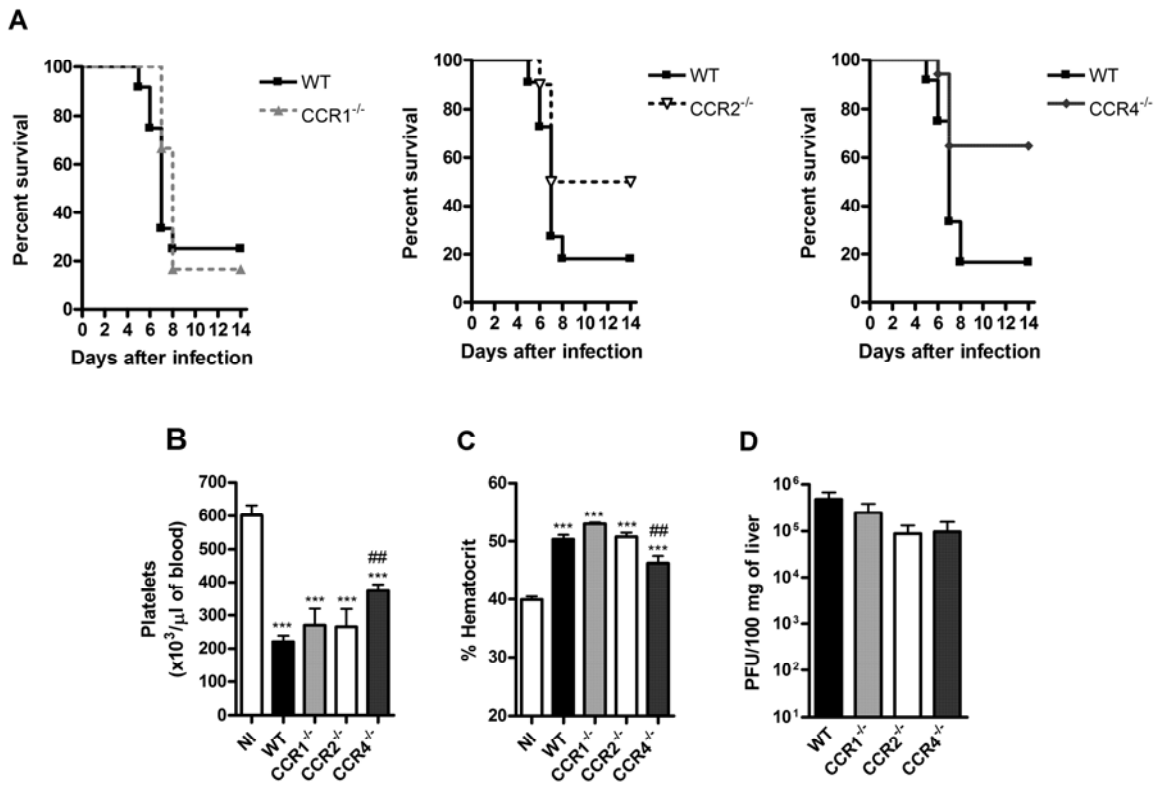
513

514

515

516 **Figure 1**

517



518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

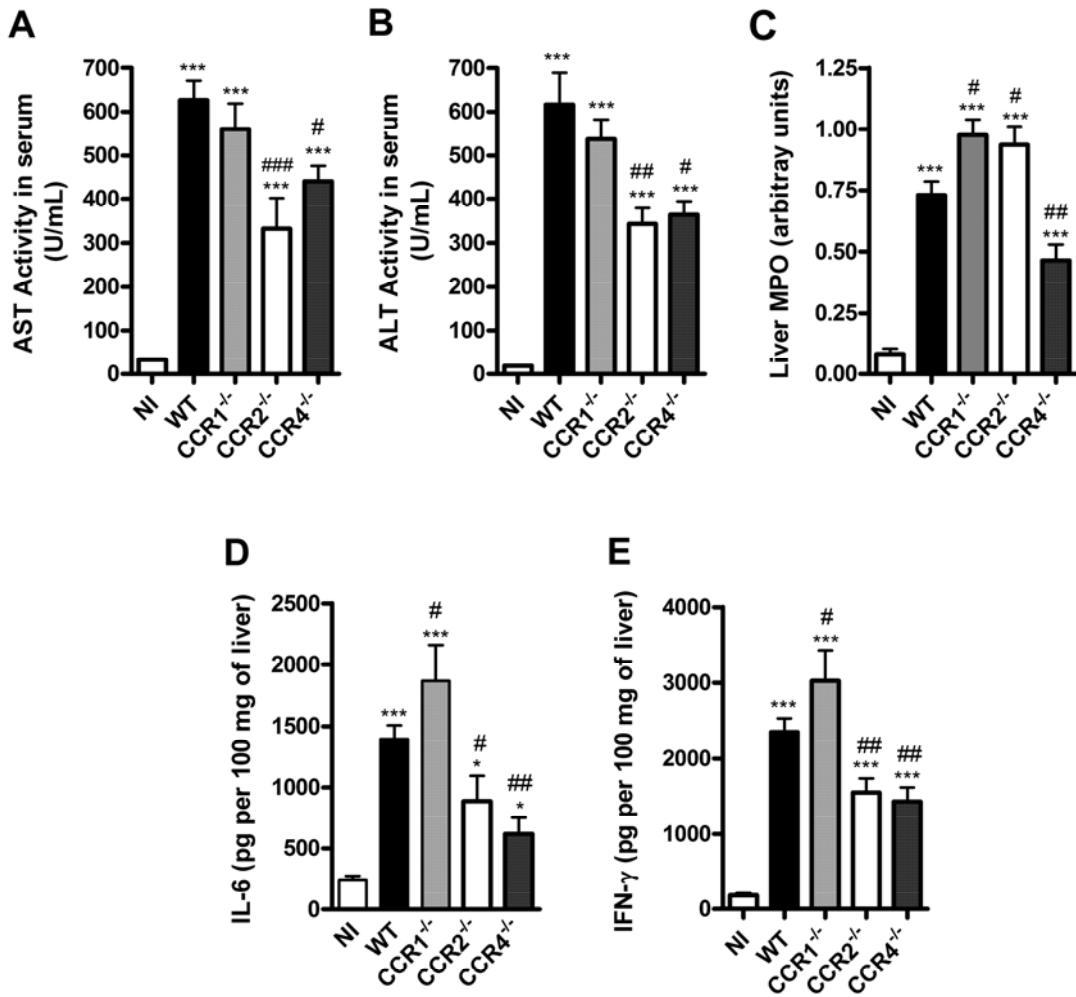
538

539

540

541

542 **Figure 2**



543

544

545

546

547

548

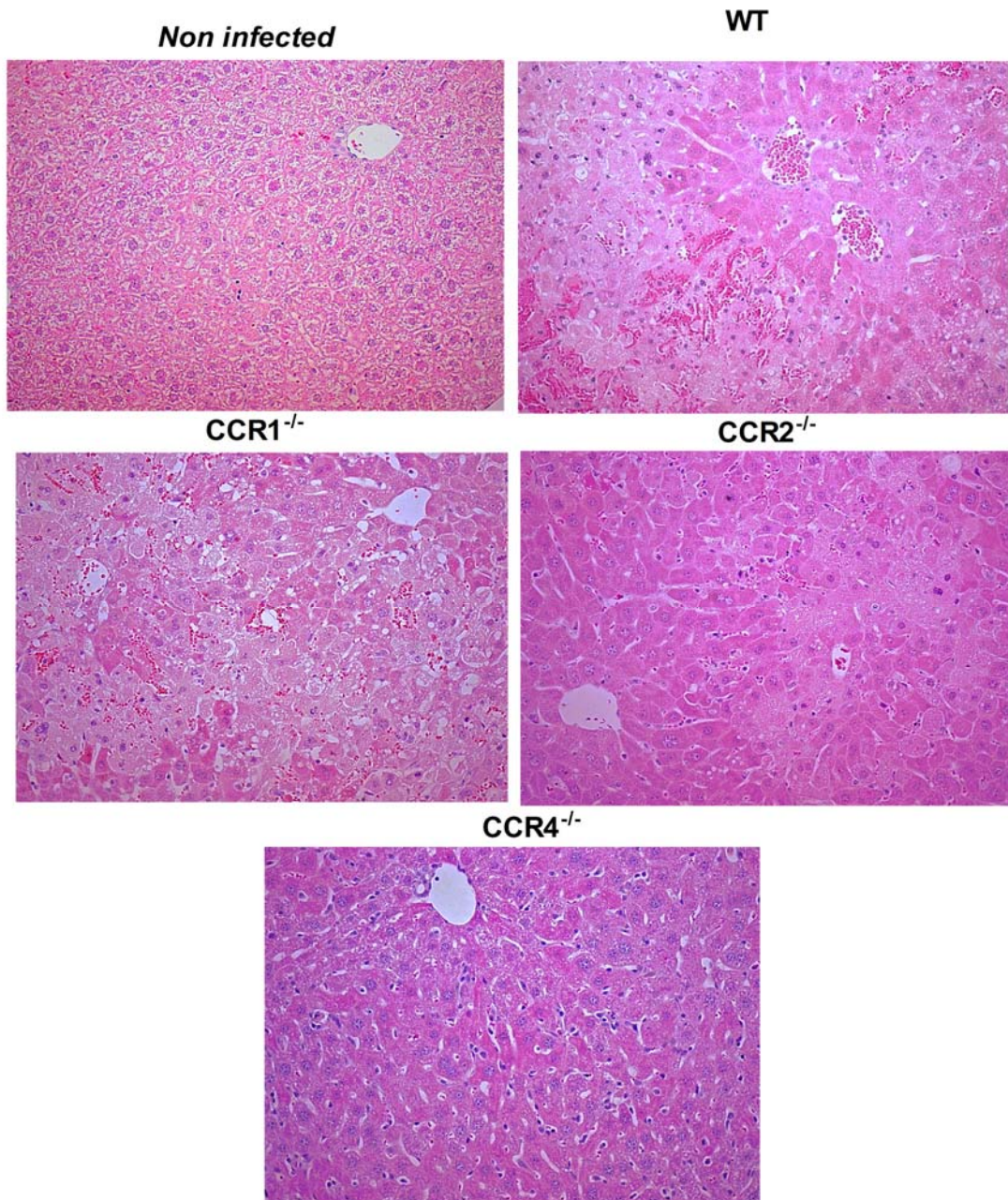
549

550

551

552

553 **Figure 3**



554

555

556

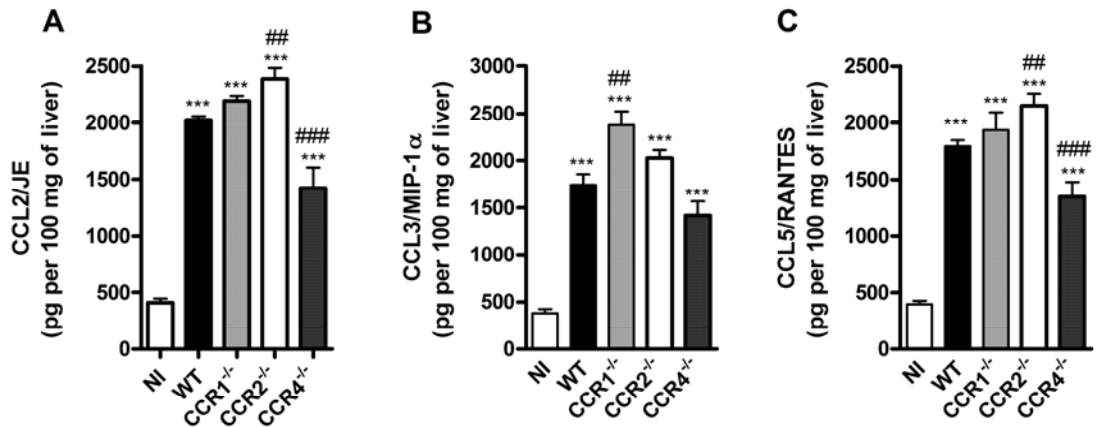
557

558

559

560

561 **Figure 4**

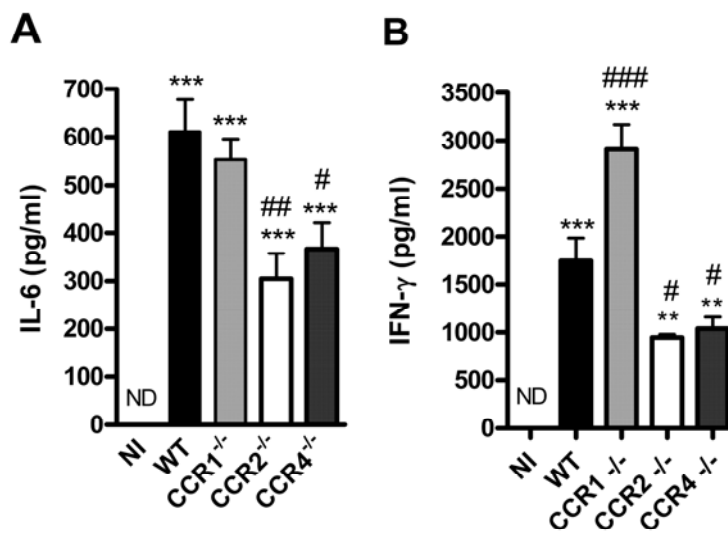


562

563

564 **Figure 5**

565



566

567

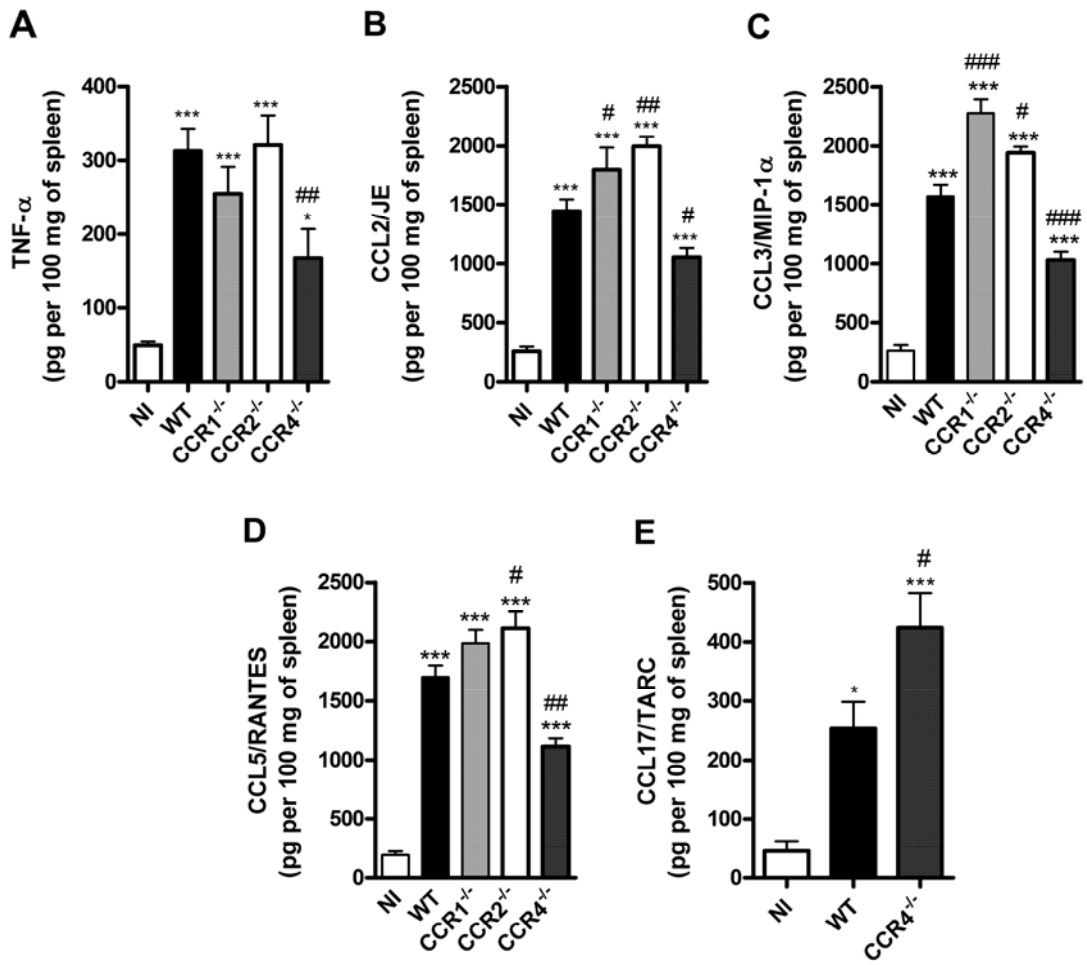
568

569

570

571

572



574

575

576

577

578

579

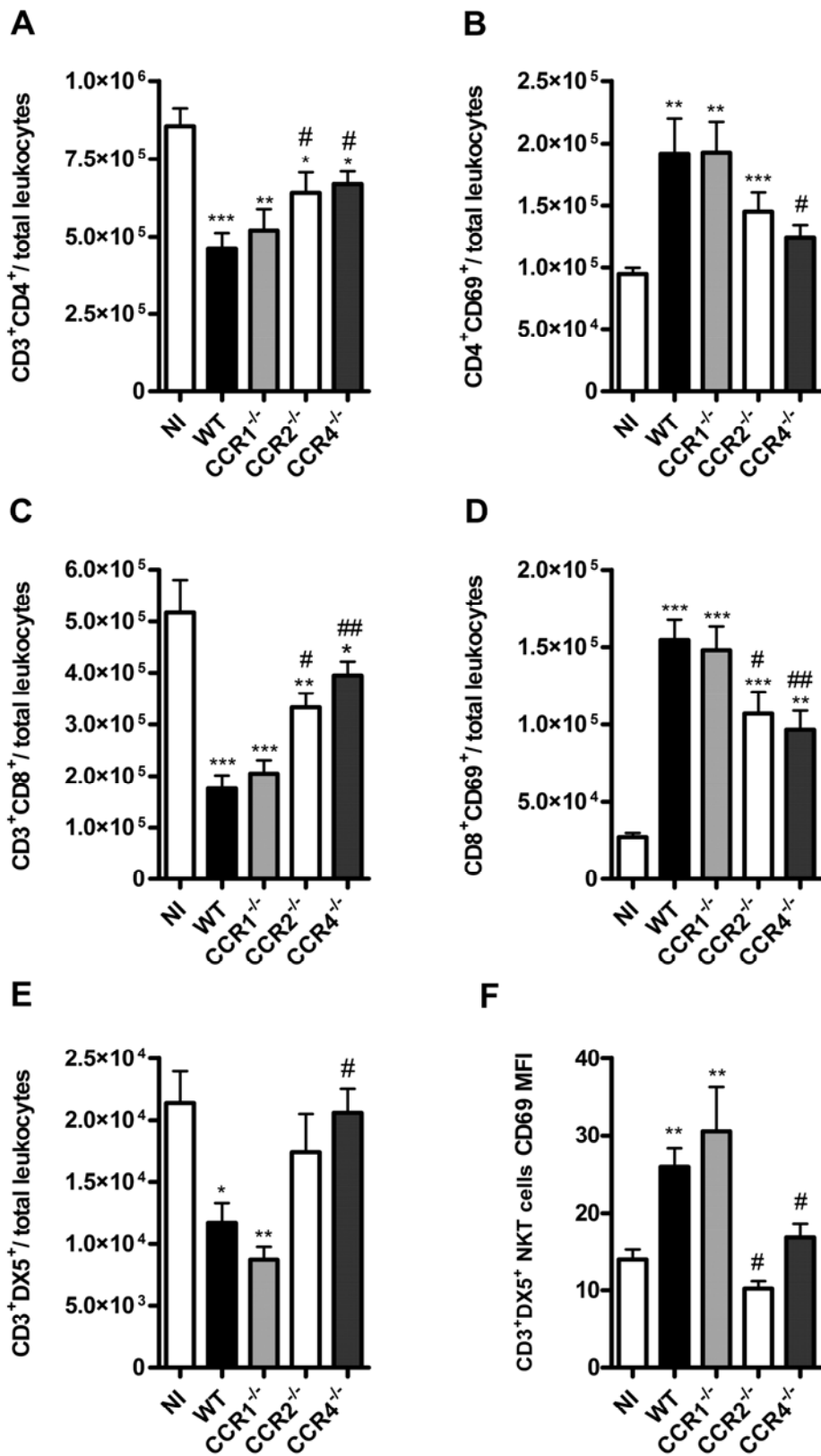
580

581

582

583

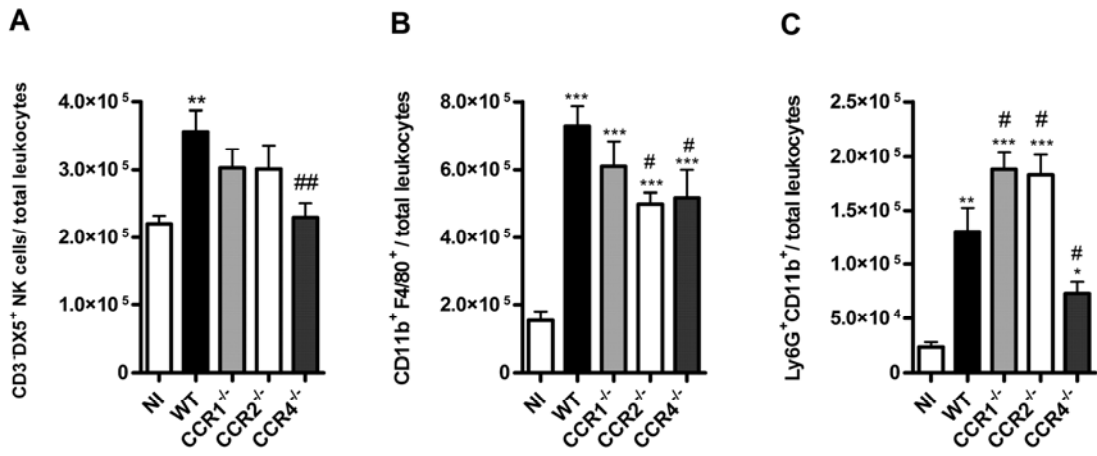
584





588

589 **Figure 8**



590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

608 **References**

- 609 1. Guzman MG, Kouri G (2002) Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2: 33-42.
- 610 2. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR (2004) Emerging flaviviruses: the spread and  
611 resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10: S98-  
612 109.
- 613 3. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, et al. (1997) Early  
614 clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis* 176: 313-321.
- 615 4. Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, et al. (2006) The WHO dengue  
616 classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* 368: 170-173.
- 617 5. Gibbons RV, Vaughn DW (2002) Dengue: an escalating problem. *BMJ* 324: 1563-1566.
- 618 6. Balmaseda A, Hammond SN, Perez L, Tellez Y, Saborio SI, et al. (2006) Serotype-specific  
619 differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 74: 449-456.
- 620 7. Gubler DJ (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.
- 621 8. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, et al. (2001) Haiti: absence  
622 of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J*  
623 *Trop Med Hyg* 65: 180-183.
- 624 9. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, et al. (2002) Enhanced severity of  
625 secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev*  
626 *Panam Salud Publica* 11: 223-227.
- 627 10. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM (1988) A prospective study of dengue  
628 infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 38: 172-180.
- 629 11. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN (1970) Observations related to pathogenesis of  
630 dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and  
631 virus recovered. *Yale J Biol Med* 42: 311-328.
- 632 12. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, et al. (1997) Risk factors in dengue shock  
633 syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 56: 566-572.
- 634 13. Clyde K, Kyle JL, Harris E (2006) Recent advances in deciphering viral and host  
635 determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80: 11418-11431.
- 636 14. Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Thisayakorn U, et al. (2003)  
637 Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand  
638 from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg* 68: 191-202.
- 639 15. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, et al. (2000) Dengue  
640 viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease  
641 severity. *J Infect Dis* 181: 2-9.
- 642 16. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD (2009) Dengue virus pathogenesis: an integrated  
643 view. *Clin Microbiol Rev* 22: 564-581.
- 644 17. Balmaseda A, Saborio S, Tellez Y, Mercado JC, Perez L, et al. (2008) Evaluation of  
645 immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue  
646 diagnosis and epidemiological studies. *J Clin Virol* 43: 287-291.
- 647 18. Rodriguez-Madoz JR, Bernal-Rubio D, Kaminski D, Boyd K, Fernandez-Sesma A  
648 Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic  
649 cells. *J Virol* 84: 4845-4850.
- 650 19. Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, et al. (1999) Report of a  
651 fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in  
652 hepatocytes and liver apoptosis. *Hum Pathol* 30: 1106-1110.

- 653 20. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT (2004) Localization of dengue virus in  
654 naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J*  
655 *Infect Dis* 189: 1411-1418.
- 656 21. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, et al. (2006) MCP-1, a highly expressed  
657 chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause  
658 permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium  
659 cells. *J Gen Virol* 87: 3623-3630.
- 660 22. Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL (2005) Dengue virus nonstructural protein NS5  
661 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol* 79: 11053-11061.
- 662 23. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L (2005) Innate immune responses to  
663 dengue virus. *Arch Med Res* 36: 425-435.
- 664 24. Brown KL, Cosseau C, Gardy JL, Hancock RE (2007) Complexities of targeting innate  
665 immunity to treat infection. *Trends Immunol* 28: 260-266.
- 666 25. Speyer CL, Gao H, Rancilio NJ, Neff TA, Huffnagle GB, et al. (2004) Novel chemokine  
667 responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am J Pathol* 165: 2187-  
668 2196.
- 669 26. Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90: 909-928.
- 670 27. Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in  
671 immunity. *Immunity* 12: 121-127.
- 672 28. Mantovani A (1999) Chemokines. Introduction and overview. *Chem Immunol* 72: 1-6.
- 673 29. Murphy PM (1994) The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu*  
674 *Rev Immunol* 12: 593-633.
- 675 30. Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392: 565-568.
- 676 31. Locati M, Otero K, Schioppa T, Signorelli P, Perrier P, et al. (2002) The chemokine  
677 system: tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in  
678 polarized responses. *Allergy* 57: 972-982.
- 679 32. Mantovani A (1999) The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol*  
680 *Today* 20: 254-257.
- 681 33. Glass WG, Rosenberg HF, Murphy PM (2003) Chemokine regulation of inflammation  
682 during acute viral infection. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3: 467-473.
- 683 34. Horuk R, Proudfoot AE (2009) Drug discovery targeting the chemokine system--where  
684 are we? *Front Biosci (Elite Ed)* 1: 209-219.
- 685 35. Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM Anti-inflammatory drug development: Broad or  
686 specific chemokine receptor antagonists? *Curr Opin Drug Discov Devel* 13: 414-427.
- 687 36. Locati M, Murphy PM (1999) Chemokines and chemokine receptors: biology and clinical  
688 relevance in inflammation and AIDS. *Annu Rev Med* 50: 425-440.
- 689 37. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, et al. (2008) Multiplex  
690 cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive  
691 factors for severity. *BMC Infect Dis* 8: 86.
- 692 38. Spain-Santana TA, Marglin S, Ennis FA, Rothman AL (2001) MIP-1 alpha and MIP-1  
693 beta induction by dengue virus. *J Med Virol* 65: 324-330.
- 694 39. Sierra B, Perez AB, Vogt K, Garcia G, Schmolke K, et al. MCP-1 and MIP-1alpha  
695 expression in a model resembling early immune response to dengue. *Cytokine*.
- 696 40. Conceicao TM, El-Bacha T, Villas-Boas CS, Coello G, Ramirez J, et al. Gene expression  
697 analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate  
698 immune response. *J Infect* 60: 65-75.
- 699 41. Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR (2007) Infection of human primary  
700 hepatocytes with dengue virus serotype 2. *J Med Virol* 79: 300-307.
- 701 42. Schnittler HJ, Feldmann H (2003) Viral hemorrhagic fever--a vascular disease? *Thromb*  
702 *Haemost* 89: 967-972.

- 703 43. Assuncao-Miranda I, Amaral FA, Bozza FA, Fagundes CT, Sousa LP, et al. Contribution  
704 of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus  
705 infection. *FASEB J* 24: 218-228.
- 706 44. Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G (2003) Anti-TNF antibody  
707 treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol*  
708 *Med Microbiol* 35: 33-42.
- 709 45. Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, Amaral FA, Souza RS, et al. (2009) Essential role of  
710 platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc*  
711 *Natl Acad Sci U S A* 106: 14138-14143.
- 712 46. King CA, Anderson R, Marshall JS (2002) Dengue virus selectively induces human mast  
713 cell chemokine production. *J Virol* 76: 8408-8419.
- 714 47. Lin YL, Liu CC, Chuang JI, Lei HY, Yeh TM, et al. (2000) Involvement of oxidative  
715 stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver  
716 cells. *Virology* 276: 114-126.
- 717 48. Shresta S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E (2004) Early activation of natural killer and  
718 B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology* 319: 262-  
719 273.
- 720 49. Souza DG, Guabiraba R, Pinho V, Bristow A, Poole S, et al. (2003) IL-1-driven  
721 endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute  
722 inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *J Immunol* 170: 4759-  
723 4766.
- 724 50. Binh PT, Matheus S, Huong VT, Deparis X, Marechal V (2009) Early clinical and  
725 biological features of severe clinical manifestations of dengue in Vietnamese adults. *J*  
726 *Clin Virol* 45: 276-280.
- 727 51. Green S, Rothman A (2006) Immunopathological mechanisms in dengue and dengue  
728 hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* 19: 429-436.
- 729 52. Srikiatkachorn A (2009) Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thromb*  
730 *Haemost* 102: 1042-1049.
- 731 53. Srikiatkachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, et  
732 al. (2007) Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial  
733 ultrasonographic study. *Pediatr Infect Dis J* 26: 283-290; discussion 291-282.
- 734 54. Juffrie M, van Der Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, et al. (2000) Inflammatory  
735 mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to  
736 neutrophil degranulation. *Infect Immun* 68: 702-707.
- 737 55. Fink K, Ng C, Nkenfou C, Vasudevan SG, van Rooijen N, et al. (2009) Depletion of  
738 macrophages in mice results in higher dengue virus titers and highlights the role of  
739 macrophages for virus control. *Eur J Immunol* 39: 2809-2821.
- 740 56. Kyle JL, Balsitis SJ, Zhang L, Beatty PR, Harris E (2008) Antibodies play a greater role  
741 than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection  
742 in a mouse model. *Virology* 380: 296-303.
- 743 57. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, et al. (2004) Interferon-  
744 dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in  
745 mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol* 78: 2701-  
746 2710.
- 747 58. Cardona AE, Sasse ME, Liu L, Cardona SM, Mizutani M, et al. (2008) Scavenging roles  
748 of chemokine receptors: chemokine receptor deficiency is associated with increased  
749 levels of ligand in circulation and tissues. *Blood* 112: 256-263.
- 750 59. Johnston B, Burns AR, Suematsu M, Issekutz TB, Woodman RC, et al. (1999) Chronic  
751 inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to  
752 monocyte chemoattractant protein-1. *J Clin Invest* 103: 1269-1276.

- 753 60. Nouri-Aria KT, Wilson D, Francis JN, Jopling LA, Jacobson MR, et al. (2002) CCR4 in  
754 human allergen-induced late responses in the skin and lung. *Eur J Immunol* 32: 1933-  
755 1938.
- 756 61. Schuh JM, Power CA, Proudfoot AE, Kunkel SL, Lukacs NW, et al. (2002) Airway  
757 hyperresponsiveness, but not airway remodeling, is attenuated during chronic  
758 pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR4<sup>-/-</sup> mice. *FASEB J* 16: 1313-  
759 1315.
- 760 62. Vijayanand P, Durkin K, Hartmann G, Morjaria J, Seumois G, et al. Chemokine receptor  
761 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients. *J*  
762 *Immunol* 184: 4568-4574.
- 763 63. Yuan Q, Bromley SK, Means TK, Jones KJ, Hayashi F, et al. (2007) CCR4-dependent  
764 regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 204: 1327-1334.
- 765 64. Luster AD (2001) Antichemokine immunotherapy for allergic diseases. *Curr Opin Allergy*  
766 *Clin Immunol* 1: 561-567.
- 767 65. Di Stasi A, De Angelis B, Rooney CM, Zhang L, Mahendravada A, et al. (2009) T  
768 lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have  
769 improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood* 113: 6392-  
770 6402.
- 771 66. Traeger T, Kessler W, Assfalg V, Cziupka K, Koerner P, et al. (2008) Detrimental role of  
772 CC chemokine receptor 4 in murine polymicrobial sepsis. *Infect Immun* 76: 5285-  
773 5293.
- 774 67. Chvatchko Y, Hoogewerf AJ, Meyer A, Alouani S, Juillard P, et al. (2000) A key role for  
775 CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Exp Med*  
776 191: 1755-1764.
- 777 68. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Evanoff HL, et al. (2000)  
778 Pivotal role of the CC chemokine, macrophage-derived chemokine, in the innate  
779 immune response. *J Immunol* 164: 5362-5368.
- 780 69. Kim CH, Johnston B, Butcher EC (2002) Trafficking machinery of NKT cells: shared and  
781 differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT  
782 cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100: 11-16.
- 783 70. Semmling V, Lukacs-Kornek V, Thaiss CA, Quast T, Hochheiser K, et al. Alternative  
784 cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-  
785 licensed DCs. *Nat Immunol* 11: 313-320.

## **ANEXO II**

**A detrimental role for invariant Natural Killer T cells in the pathogenesis of  
dengue virus infection**

***The Journal of Immunology (Under review)***

# **A detrimental role for invariant Natural Killer T cells in the pathogenesis of dengue virus infection<sup>1</sup>**

Joelle Renneson<sup>\* † ‡ § \*\*</sup>, Rodrigo Guabiraba<sup>¶ || \*\*</sup>, Rafael Elias M Pereira-Silva<sup>¶</sup>, Stoyan Ivanov<sup>\* † ‡ §</sup>, Josette Fontaine<sup>\* † ‡ §</sup>, Christophe Paget<sup>\* † ‡ §</sup>, Bernhard Ryffel<sup>||</sup>, Valérie Quesniaux<sup>||</sup>, Christelle Faveeuw<sup>\* † ‡</sup>, Mauro M. Teixeira<sup>¶</sup> and François Trottein<sup>\* † ‡ § 2</sup>

<sup>\*</sup>Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019 Lille, France;

<sup>†</sup> Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France;

<sup>‡</sup>CNRS, UMR 8204, F-59021 Lille, France;

<sup>§</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019 Lille, France;

<sup>¶</sup>Immunopharmacology, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, MG 31270-901, Belo Horizonte, Brazil;

<sup>||</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6218, Molecular Immunology and Embryology, Université d'Orléans, 45071 Orléans, France ;

\*\* Both authors contributed equally to this work.

Address correspondence and reprint requests to Dr. François Trottein, Center for Infection and Immunity of Lille, Inserm U1019-CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France. E-mail: francois.trottein@pasteur-lille.fr

**Keywords:** Dengue virus, iNKT cells, inflammation, shock, cytokines

**Running title:** iNKT cells in dengue virus infection

## Abstract

Dengue virus (DV), a mosquito-borne flavivirus, is a serious public health problem in many tropical countries. Immune mechanisms involved in protection and pathogenesis of DV infection have not been fully elucidated. In this report, we assessed the *in vivo* physiological contribution of invariant Natural Killer T (iNKT) cells, a population of non-conventional  $\alpha\beta$  T lymphocytes, to the host response during experimental DV infection. To this end, a mouse-adapted DV serotype 2 that causes a disease that resembles severe dengue in humans was used. We first show that splenic and hepatic iNKT cells became activated, in terms of CD69 up-regulation and IFN- $\gamma$  production, upon DV challenge. Strikingly, C57BL/6 mice deficient in iNKT cells ( $J\alpha 18^{-/-}$ ) resisted to lethal infection in comparison to wild-type (WT) animals, which succumbed to infection around day 7 post-infection. The phenotype was partially recovered by adoptive transfer of iNKT cells to  $J\alpha 18^{-/-}$  animals. Infection of  $J\alpha 18^{-/-}$  mice was associated with decreased systemic and local inflammatory responses, as seen by lower levels of IL-6, IFN- $\gamma$  and CXCL-1/KC, reduced liver injury and diminished activation of NK cells and neutrophils. In parallel with the reduced inflammatory response, the viral load in the spleen and liver was lower in  $J\alpha 18^{-/-}$  mice relative to WT mice. Taken together, these data demonstrate for the first time that iNKT cell activation during DV infection contributes to the systemic and local inflammatory responses that lead to shock and death.



## Introduction

Dengue virus (DV)<sup>3</sup> is a serious public health problem in tropical and subtropical areas. In the past 60 years, the incidence, distribution and clinical severity of dengue cases have increased dramatically (1,2). There are estimated 50-100 million infections each year, of which there are 500,000 cases of severe dengue hemorrhagic fever and 24,000 deaths (2,3). DV is a single-stranded RNA virus that belongs to the *Flaviviridae* family and is transmitted to humans by *Aedes* mosquitoes, mainly *Aedes aegypti*. Infection with any of the four serotypes of DV results in clinical symptoms that range from classical dengue fever to severe dengue hemorrhagic fever and shock syndrome, as defined by WHO (4). Severe forms are life-threatening and characterized by hemorrhagic manifestations, hemoconcentration, thrombocytopenia and increased vascular permeability (1,5). Despite a growing public health problem, there is currently no vaccine and no specific therapeutic agents available. Therapy is supportive and may require administration of intravenous fluids, which places a serious burden on health systems of low income countries.

The pathogenesis of DV remains poorly understood and involves a complex interplay of viral and host factors. Among the risk factors for severe disease, we can include age (1,6), viral serotype (7) and genotype (8), the genetic background of the host and previous infection with a distinct serotype (9). The latter factors appear to interact to enhance viral replication and viral load. Ultimately, DV can interact with target cells, including dendritic cells (DCs), monocytes/macrophages, hepatocytes and endothelial cells (10-13), resulting in the production of immune and inflammatory mediators that shape innate and acquired immune responses and the risk of disease. Indeed, studies have suggested that the dysfunction of vascular endothelial cells leading to plasma leakage is mediated by host immune response (14). The production of high levels of pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IFN- $\gamma$ , has been reported in patients with severe dengue disease (5,15). However, it

is not clearly understood how this massive cytokine production is induced and eventually controlled. Similarly, the nature of effector and bystander cells able to control DV challenge during the early phase of infection is still elusive.

Invariant natural killer T (iNKT) cells represent a unique subpopulation of  $\alpha\beta$  T lymphocytes expressing markers associated with the NK lineage and recognizing lipid Ags through their TCR (for reviews, (16-21)). These cells express an invariant TCR $\alpha$  chain (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 rearrangement in mice and V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 rearrangement in humans) that pairs with a limited number of V $\beta$  chains. Unlike conventional T lymphocytes that recognize peptide:MHC complexes, the TCR of iNKT cells detects a limited number of self and foreign (glyco)lipids presented by the non-polymorphic MHC class I-like protein CD1d expressed by APCs, including DCs (for reviews, (16-21)). Exposure of iNKT cells with the synthetic, non-physiological, glycolipid  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) promptly induces the production of large amounts of Th1- and Th2-associated cytokines that leads to downstream activation of DCs, NK cells, B cells and conventional T cells (22,23). This enables iNKT cells to influence the outcome of developing or ongoing immune reactions with, in general, beneficial effects on infection and cancer. Several *in vivo* models demonstrated that upon natural activation, iNKT cells generally play part in the clearance of infectious agents (for reviews, (18,20,24-26)). For instance, during viral infection, iNKT cells provide innate surveillance against virally infected cells through the swift production of IFN- $\gamma$  and other pro-inflammatory cytokines. Considering the role of IFN- $\gamma$  and other pivotal cytokines in the control of DV infection (27), we investigated the role of iNKT cells during experimental DV infection in mice. To this end, we used a model which was previously shown to develop a disease that resembles the severe dengue infection that affects humans (28,29). Our findings reveal a crucial role of iNKT cells in driving the systemic and local inflammatory responses that cause the disease associated with DV infection. In contrast, iNKT cell functions appear not to be necessary for the control

of primary DV infection. Together, our data reveal a novel and critical role for iNKT cells in the pathogenesis of severe dengue disease.

## **Material and methods**

### *Mice*

Eight to ten week-old female wild type (WT) C57BL/6 (H-2D<sup>b</sup>) mice were purchased from Janvier (Le Genest-St-Isle, France) and kept with autoclaved food and water available *ad libitum* under specific pathogen-free conditions in the animal facility of the Transgenose Institute (CNRS, Orléans, France). J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice, backcrossed at least 10 times in C57BL/6, were a kind gift from Dr M. Taniguchi (RIKEN Institute, Yokohama, Japan) (22). For infectious protocol, the mice were kept in isolated ventilated cages in the biohazard animal unit. All experimental procedures were approved and complied with the French government's ethical and animal experiment regulations.

### *Virus*

The mouse-adapted DV serotype 2 strain P23085 (GenBank: AY927231.1) was obtained from the State Collection of Viruses, Moscow, Russia, and adapted as previously described (30). For the current experiments, the DV strain was passaged in LLC MK2 cells (Kidney, Rhesus monkey, ATCC) to produce stocks which were stored in MEM at -70°C. To calculate virus titre, expressed as LD<sub>50</sub>, in LLC MK2 cells supernatants, groups of ten mice were inoculated i.p. with serial dilutions of the virus and lethality was recorded. The titre of DV stock was 10<sup>5</sup> LD<sub>50</sub>/ml of LLC MK2 supernatant, as calculated in 8-10 week-old BALB/c mice, a more susceptible lineage (27).

### *Infection and experimental procedure*

For DV infection, mice were handled and kept in the biohazard animal unit of the Transgenose Institute (CNRS, Orléans, France). The virus-containing LLC MK2 supernatants were diluted in endotoxin-free PBS and injected i.p. into mice. Mock-treated animals were

inoculated with MEM supernatants from non-infected LLC MK2 cells diluted in a similar manner. For the evaluation of lethality and inflammation, mice were inoculated i.p. with 30 LD<sub>50</sub> of DV, a lethal dose (LD) that caused death of all animals between days 6 and 7. Lethality and body weight loss were evaluated every 12 hrs. At day 5, blood was recovered for serum preparation and haematological analysis. Platelets and relative percentages of granulocytes, monocytes and lymphocytes were counted in a Coulter counter (S-Plus Jr, Beckman Coulter, Paris, France). Spleen and liver samples were recovered for cytokine measurement and viral titration. Liver samples were also used for histological analysis. At days 3 and 5, spleen and liver were used for FACS analysis. At day 5, there was significant disease but animals had not succumbed to infection.

#### *Titration of virus*

Mice were assayed for viral titers in spleen and liver. For virus recovery, the organs were collected aseptically and stored at -70 °C until assayed for DV. Tissue samples were weighed, grounded by using a pestle and mortar and prepared as 10% (w/v) homogenates in MEM without fetal bovine serum. Viral load in supernatant of tissue homogenates was assessed by direct plaque assays using LLC-MK2 cells overlayed on CMC (Carboxymethylcellulose, Sigma). Briefly, samples of organ homogenates were diluted serially and a 0.5 ml volume placed in duplicate into each of 6-wells of LLC-MK2 cell monolayers and incubated for 1 hr. An overlay solution containing 199 medium (Gibco) with Earle's salts, L-glutamine and 3% FBS in 1,5% CMC was added to each well and the cultures incubated for 9 days. Cultures were stained with crystal violet for enumeration of viral plaques. The results were measured as plaque forming units (PFU) per 100 mg of tissue weight. The limit of detection of the assay was 100 PFU/100 mg of tissue.

### *Quantification of cytokine and chemokine concentration*

Sera and tissue extracts were analyzed for IFN- $\gamma$  (eBiosciences, CliniSciences, Montrouge, France) and IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC and IL-12 p40 (R&D systems, Abingdon, UK) using ELISA kits, according to the manufacturer's instructions.

### *Histopathology*

A portion of liver was obtained from mice killed at day 6, immediately fixed in 4% buffered formalin and tissue fragments were embedded in paraffin. Tissue sections (4  $\mu$ m thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined under light microscopy for inflammatory changes using a semi-quantitative score.

### *Preparation of liver and spleen cells*

Livers were perfused via the venous sinus with PBS to remove circulating blood cells. Perfused livers were finely minced and treated by enzymatic digestion for 20 minutes at 37°C in RPMI containing 1 mg/ml collagenase type VIII (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 1  $\mu$ g/ml DNase type I (Sigma-Aldrich). After wash, cell suspensions were resuspended in a 36% Percoll™ gradient, carefully layered onto 72% Percoll™ and centrifuged for 30 min at 2300 rpm, without brake at 22°C. Hepatic leukocyte populations collected at the interface were washed in PBS 2% FCS. Spleens were collected and homogenized using 100  $\mu$ M cell strainers (BD Biosciences, USA). Red blood cells were removed with lysis buffer (Sigma-Aldrich).

### *Flow cytometry*

Monoclonal Abs against mouse TCR $\beta$  (FITC-conjugated), NK1.1 (PE- or PerCp-Cy5.5-conjugated), CD5 (FITC- or APC-conjugated), CD4 (FITC-conjugated), CD8 (APC-

conjugated), CD69 (PE-, PerCp-Cy5.5- or APC-conjugated), IFN- $\gamma$  (Alexa Fluor<sup>®</sup> 647-conjugated), IL-4 (APC-conjugated), CD11c (PE-Cy7-conjugated), CD11b (PerCp-Cy5.5-conjugated), Ly6G (Alexa Fluor<sup>®</sup> 647-conjugated), CD62-L (PE-conjugated) and isotype controls were all purchased from BD Pharmingen. Monoclonal Abs against granzyme B (FITC-conjugated), CD107 $\alpha$  (PE-conjugated) and isotypes control were purchased from eBioscience. PE-conjugated PBS-57 glycolipid-loaded CD1d tetramer was from the NIAID Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA). To analyze iNKT cells, mononuclear cell suspensions were incubated with appropriate dilutions of PBS-57-loaded CD1d tetramer-PE for 30 min in PBS containing 2 % FCS and 0.01% NaN<sub>3</sub>. Cells were then washed and stained for other cell surface markers. For intracellular staining, cells were fixed in PBS 1% paraformaldehyde for 10 min, resuspended in PBS containing 2% FCS and 0.1 % saponin (permeabilization buffer) and incubated with Alexa Fluor<sup>®</sup> 647-conjugated mAb against IFN- $\gamma$ , IL-4 or control rat IgG1 mAb or with granzyme B-FITC or control rat IgG2b mAb. Cells were acquired on a BD FACSCanto II (BD Biosciences) cytometer and analyzed using the FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR).

#### *iNKT purification and adoptive transfer*

For adoptive transfer experiments, liver cells from WT donor mice were stained with anti-NK1.1 (PE-conjugated) and anti-CD5 (APC-conjugated) mAbs (BD Pharmingen). Labelled cells were isolated using a FACS Aria and BD FACSDiva software (BD Biosciences). J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> recipient mice were inoculated intravenously either with 1 x 10<sup>6</sup> purified NKT cells or with the same volume of medium alone 18 hours before DV infection. Of note, iNKT cells represent around 90% of the total NKT cells in the liver.

### *Statistical analysis*

Data were analyzed with GraphPad Prism 4 Software (San Diego, USA). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical significances of difference between experimental groups were calculated using the two-tailed unpaired Student's t test. Survival of mice was compared using Kaplan-Meier analysis and log-rank test. Results with a *P* value of less than 0.05 were considered significant.



## Results

### *iNKT cells become activated during DV infection*

An important feature of iNKT cells during stressful conditions is to rapidly become activated to initiate innate and adaptive immune responses. We first investigated the activation status of iNKT cells during the course of DV infection. As depicted in Figure 1A (*upper panel*), relative to mock-treated mice, the frequency and absolute number (data not shown) of splenic iNKT (PBS-57-loaded CD1d tetramer<sup>+</sup> TCRβ<sup>+</sup>) cells remained stable 3 days post-infection (p.i.), but decreased by ~50% at day 5 p.i.. This apparent disappearance of iNKT cells can occasionally occur during infection, a phenomenon observed following TCR-dependent activation of these cells and due to TCR internalization (31-33). To further study the activation status of iNKT cells, we monitored the expression of the early activation marker CD69. As revealed in Figure 1A (*lower panel*), the level of CD69 expression on iNKT cells was dramatically increased at day 5 p.i., whereas it remained unchanged at day 3 p.i.. Of note, NK (CD5<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) cells increased CD69 expression with the same kinetic.

During infection, iNKT cells are among the first cells to produce cytokines that have multiple effects on other immune and non-immune cells. Therefore, we determined whether iNKT cells expressed the prototypical Th1- and/or Th2-associated cytokines, namely IFN-γ and/or IL-4, during DV infection. Compared to mock-treated animals, DV infection resulted in an increased frequency of iNKT cells positive for IFN-γ, but not for IL-4 (data not shown) 5 days p.i. (Fig. 1B). In contrast, 3 days p.i., iNKT cells remained negative for IFN-γ. Similarly, NK cells also express IFN-γ intracellularly 5 days, but not 3 days, p.i.. Of note, similar data were obtained when liver iNKT and NK cells were analyzed (data not shown). Altogether, these results show that DV infection is accompanied by systemic activation of iNKT cells 5 days p.i., a time point that just precedes the peak of viral replication at day 6.

### *Mice deficient in iNKT cells survive to lethal DV challenge*

We have previously shown that mice infected with a mouse-adapted DV serotype 2 strain have a disease that resembles the severe disease observed in humans (29,30,34). In this system, disease is associated with an acute systemic inflammation, thrombocytopenia and increased vascular permeability that eventually lead to shock and death. To address the potential role of iNKT cells in the development and/or control of the immunopathology, WT and  $J\alpha 18^{-/-}$  mice were infected with a lethal dose (30 LD<sub>50</sub>) of DV and monitored daily for changes in body weight and survival. As seen in Figure 2A, infection of WT mice was associated with rapid weight loss starting at day 4 p.i. and all mice succumbed to disease 6 to 7 days after infection. Strikingly, mice deficient in iNKT cells did not lose weight and survived to the infection out to day 22 p.i. (Fig. 2A and data not shown). To further show the involvement of iNKT cells in DV-associated mortality,  $J\alpha 18^{-/-}$  mice were reconstituted with iNKT cells purified from naive animals and then challenged with a lethal dose of DV. Although no significant weight loss was noticed, 40% of reconstituted  $J\alpha 18^{-/-}$  mice died from DV infection between 6 and 10 days p.i. (Fig. 2B). Thus, our data show an unexpected role of iNKT cells in DV-associated lethality.

### *iNKT cell-deficient mice develop less severe disease after DV infection*

Thrombocytopenia occurs in around 70% of DV-infected patients but does not necessarily correlate with disease severity or outcome. As seen in Figure 3A, there was significant decrease of platelet counts in infected WT and  $J\alpha 18^{-/-}$  mice, albeit the decrease was less intense in the latter group. Neutrophils may become activated, accumulate in tissues and contribute to organ damage in the context of DV infection (35). In DV-infected WT mice, the percentage of circulating granulocytes increased in a significant manner compared to mock-treated WT mice. Of interest, this enhanced frequency was not observed in the blood of

infected  $J\alpha 18^{-/-}$  mice. Finally, the frequencies of monocytes and lymphocytes were not dramatically different between infected WT and  $J\alpha 18^{-/-}$  mice. We next measured the levels of inflammatory cytokines in the serum of infected mice. As Figure 3B shows, the concentration of IL-6 and IFN- $\gamma$  was strongly increased in plasma of infected WT animals. Strikingly, levels of these cytokines were significantly lower in infected  $J\alpha 18^{-/-}$  mice. To compare the extent of tissue injury, liver from WT and  $J\alpha 18^{-/-}$  mice were analysed at day 6 p.i.. H&E-stained liver sections clearly revealed evident signs of congestion, haemorrhage, hepatocyte degeneration and necrosis in infected WT mice (Fig. 3C). In marked contrast, relative to iNKT cell competent animals, the structure of the liver was preserved in infected  $J\alpha 18^{-/-}$  mice. Analysis of liver section revealed a diminished inflammation and an absence of hepatocyte degeneration and necrosis in iNKT cell deficient animals. In aggregate, these data suggest that iNKT cells contribute significantly to DV-associated disease and tissue damage.

*Mice deficient in iNKT cells display reduced production of inflammatory cytokines*

The cytokine “storm” that follows infection correlates with dengue disease severity and is believed to contribute to the pathogenesis of severe dengue (5). As revealed in Figure 4 (and data not shown), there were increased levels of IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-12p40 transcripts and proteins in the spleen of WT animals between days 4 and 6 after infection. Similarly, infected WT mice produced a higher level of the inflammatory chemokine CXCL-1/KC, known to rapidly mobilize neutrophils, from day 4 p.i. with a peak at day 6 p.i.. Strikingly, the concentrations of these inflammatory markers were significantly reduced in the spleen of infected  $J\alpha 18^{-/-}$  mice. Moreover, levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  tended to be lower in infected  $J\alpha 18^{-/-}$  mice than infected WT mice (data not shown). Altogether, the results above show that iNKT cells drive the systemic inflammatory response that accompanies DV infection.

*Jα18<sup>-/-</sup> mice exhibit decreased activation of NK cells and neutrophils during DV infection*

*In vivo* activation of iNKT cells triggers downstream stimulation, and sometimes expansion, of various immune cells including NK cells, neutrophils and conventional T lymphocytes, known to be important during DV infection (35-37). We thus measured the impact of endogenous iNKT cell activation on the frequency and activation status of these cells. As seen in Figure 5, DV infection was associated with reduced frequency of NK cells (panel A) and enhanced proportion of neutrophils (panel B) in the spleen of WT mice. In contrast, the frequency of both NK cells and neutrophils was not modulated in infected Jα18<sup>-/-</sup> mice. We next measured the level of surface markers associated with cell activation on these cell types. As depicted in Figure 5A (*upper right panel*), NK cells from infected WT mice expressed higher levels of CD69, whilst this induction was significantly lower on NK cells from infected Jα18<sup>-/-</sup> mice. Moreover, the expression of granzyme B (*lower left panel*) and CD107α (data not shown), two molecules known to participate in cellular cytotoxicity, was strongly up-regulated in/on NK cells from WT mice. This induction was less intense in iNKT cell-deficient animals. Activated iNKT cells can trans-stimulate NK cells to produce IFN-γ. As seen in Figure 5A (*lower right panel*), splenic NK cells from WT infected mice labelled positively for IFN-γ at day 5 p.i. whilst the frequency of IFN-γ positive NK cells was much lower in iNKT cell-deficient animals. Neutrophils become activated during DV infection (35). As Figure 5B shows, neutrophils expressed lower level of CD62-L (a sign of activation) upon DV infection. Interestingly, neutrophils failed to be activated in infected Jα18<sup>-/-</sup> mice, at least in term of CD62-L down-regulation. CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes activation has been suggested to be associated with dengue infection disease severity (36). We observed no changes in the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells and a small decrease in the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen of DV infected WT and Jα18<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5C). However, whilst both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells expressed more CD69 in DV-infected WT mice, this enhancement was less

important in infected  $J\alpha 18^{-/-}$  mice. Altogether, these results show less activation of innate (NK cells and neutrophils) and adaptive immune cells in the absence of iNKT cells upon DV infection, revealing an important and new interplay between those cell types in this experimental model.

*iNKT cells favour DV replication in infected mice*

As disease was less severe in  $J\alpha 18^{-/-}$  mice and iNKT cells may be important to deal with viral replication, it was important to measure the effects of iNKT cell deficiency on viral load. As seen in Figure 6, viral particles were detected at day 6 p.i. in the liver and spleen of both WT and  $J\alpha 18^{-/-}$  mice. Nevertheless, viral loads were significantly lower in the liver of  $J\alpha 18^{-/-}$  mice (in average:  $8.4 \times 10^2$  PFU/100 mg of tissue) when compared to their WT controls ( $4.1 \times 10^4$  PFU/100 mg of tissue). Although not significant, viral loads tended to be lower in the spleen of  $J\alpha 18^{-/-}$  mice relative to WT animals ( $3.6 \times 10^4$  vs  $1.8 \times 10^5$  PFU/100 mg of tissue). Thus, in our experimental system, iNKT cell deficiency did not result in an impaired containment and clearance of DV during infection but, on the contrary, led to a decreased viral load. This suggests that, in this infectious system, iNKT cells not only favour inflammatory injury but also virus replication.

## **Discussion**

Dengue virus causes the most prevalent arthropod-borne viral illness in humans worldwide. At present, the mechanisms of DV-induced disease and immunity are poorly defined and the protective versus pathogenic nature of the immune response to DV infection is as yet unclear. In particular, how the cytokine storm and shock, which characterize DV pathology, are induced and controlled is still elusive. Considering the role of iNKT cells in host defence mechanisms during viral infection and in the control/promotion of inflammatory responses in many systems, we questioned whether these cells play a part in the host response during DV infection. Using a mouse model of acute DV infection, our findings point to a detrimental role for iNKT cells in severe DV-associated pathology and mortality.

Invariant NKT cells play a role during viral infection, with in general a beneficial effect for the host (for reviews, (18,20,24-26,38)). No studies so far have addressed the role of these cells during infection with a flavivirus. Flaviviruses, which include DV, West Nile virus, yellow fever virus. Infection with the latter viruses induce symptomatology and clinical symptoms which include encephalitis and hemorrhagic fever (7,39-42). Although the understanding of cellular responses is growing (43,44), little is known about the participation of iNKT cells in flavivirus infections. Viral infections can lead to the activation of iNKT cells and this may strongly impact on the control of the local immune response. We first assessed the activation status of iNKT cells as well as their potential recruitment/expansion to/in the spleen and liver during DV infection. Using a lethal dose of DV, our data show that no massive expansion occurs in splenic and hepatic tissues during the early phase of infection. On the contrary, the apparent number of iNKT cells decreased 5 days p.i., a phenomenon probably due to TCR internalization following activation of these cells. Of interest, at day 5 p.i., the expression of the early activation marker CD69 was strongly increased on iNKT cells.

Furthermore, iNKT cells (as well as NK cells) express IFN- $\gamma$  intracellularly at this time point. In aggregate, iNKT cells become activated during DV infection. The mechanisms (role of the CD1d molecule and/or co-factors) by which these cells become activated during infection are presently being studied.

Excessive systemic inflammation is detrimental following DV challenge and infection of mice with DV causes an acute inflammatory response, hemorrhagic manifestations and thrombocytopenia that eventually lead to death. In our experimental system, the potent local (liver) injury, systemic inflammation and uncontrolled virus replication are important determinants of the fatal outcome. Physiologically, iNKT cells can augment or inhibit inflammatory responses through a variety of mechanisms depending on the context (*i.e.* sterile or non-sterile inflammation) and the targeted organ. Several experimental models have highlighted the beneficial role of iNKT cells in bacterial and viral-associated inflammatory responses (for reviews, (18,20,24-26,38)). On the other hand, iNKT cells can be deleterious in local and systemic inflammation. For instance, iNKT cells strongly participate in concanavalin A-induced hepatitis (45,46) and in LPS-induced (47) or cecal ligation and puncture-mediated (48) acute septic shock. Here, we evaluated their potential regulatory function in DV-induced pathology. Strikingly, in multiple repeated experiments, we consistently observed that mice lacking iNKT cells are resistant to severe DV infection and that the adoptive transfer of iNKT cells isolated from WT mice into healthy  $J\alpha 18^{-/-}$  mice partially restores mortality after DV challenge. Histological examination of liver sections revealed that, compared to WT mice, infected  $J\alpha 18^{-/-}$  developed a less acute pathology. Thus, in our system, iNKT cell deficiency reduced hepatic injury and fatal outcome suggesting that iNKT cells are detrimental in liver pathology and favour virus-associated mortality. Moreover, analysis of cytokine production indicated that iNKT cells orchestrate, either directly or

indirectly, the high local and systemic inflammatory responses. The exact mechanisms by which iNKT cells contribute to DV pathogenesis are yet to be defined. It is possible that they act through the synthesis of inflammatory cytokines able to directly or indirectly promote injury. As described in the concanavalin A-induced hepatic injury (46), it is also possible that, through FasL-Fas interaction, iNKT cells mediate cytotoxic effects on hepatocytes, thus contributing to liver pathology. Attempts are now underway to investigate these issues and to identify more subtle functions of iNKT cells in DV-associated pathology. Another possibility is that iNKT cells participate directly or indirectly in IL-17 production. Of note, as revealed by quantitative RT-PCR, we noticed a decreased production of IL-17, a cytokine known to promote recruitment of neutrophils and to mediate the progress of local and systemic inflammatory processes (49,50) in the spleen of infected  $J\alpha 18^{-/-}$  mice (data not shown). This is in line with the reduced neutrophilia observed in these mice. Attempts are now underway to identify the cellular source of IL-17 production and the relevance of this cytokine during DV infection in WT animals.

In contrast to other models, iNKT cell deficiency did not lead to an impaired containment and clearance of DV in the liver and spleen in our experimental system. This finding is not without precedent as iNKT cells have been shown to be dispensable to control the virus load in some experimental systems (51,52). Surprisingly, the viral load was even diminished (by ~10-fold) in  $J\alpha 18^{-/-}$  mice relative to WT animals. Previous findings have suggested that production of inflammatory mediators favours DV replication *in vivo* and/or *in vitro* (53-55). Thus, it is likely that, in this infectious system, iNKT cells indirectly favour virus replication by promoting inflammation. Since in  $J\alpha 18^{-/-}$  mice, the inflammatory response is strongly reduced, this positive feedback for viral replication is also downregulated. Our data show that during DV infection, iNKT cells produce IFN- $\gamma$  and that iNKT cells trans-activate NK cells to produce it. Considering the critical function of IFN- $\gamma$  in



restricting DV replication (27,56), the lack of function of the iNKT cell/NK cell pathway in virus containment in this system is somewhat surprising. The role of NK cells during DV infection is unclear. It has been proposed that they could exert cytotoxic functions on infected cells, although this activity has not yet been firmly proved *in vivo* (57-59). Of interest, the lack of iNKT cell/NK cell functions on the control of DV replication was confirmed using  $\alpha$ -GalCer. Indeed, inoculation of  $\alpha$ -GalCer, known to strongly activate the release of IFN- $\gamma$  by iNKT cells and NK cells *in vivo*, at the time of DV infection, failed to affect DV replication and was without effect on mouse survival (data not shown). Similar results were obtained when  $\alpha$ -GalCer was injected two days before DV challenge. This is the first time to our knowledge that  $\alpha$ -GalCer, used in prophylactic settings, is described to be ineffective during virus infection. This finding confirms the lack of iNKT cell functions on DV replication after natural activation.

As a whole, our data show a key role for iNKT cells in the development of pathology and mortality associated to an acute model of DV infection. It is possible that a better understanding of the mode of *in vivo* iNKT cell activation and the precise functions they exert during DV infection will be beneficial to better harness these cells for therapeutic purposes in the future, for instance through the use of iNKT cell antagonists.

## References

1. Guzman, M. G. and G. Kouri. 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect.Dis.* 2:33-42.
2. Mackenzie, J. S., D. J. Gubler, and L. R. Petersen. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat.Med.* 10:S98-109.
3. Gibbons, R. V. and D. W. Vaughn. 2002. Dengue: an escalating problem. *BMJ.* 324:1563-1566.
4. Deen, J. L., E. Harris, B. Wills, A. Balmaseda, S. N. Hammond, C. Rocha, N. M. Dung, N. T. Hung, T. T. Hien, and J. J. Farrar. 2006. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet.* 368:170-173.
5. Martina, B. E., P. Koraka, and A. D. Osterhaus. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin.Microbiol.Rev.* 22:564-581.
6. Guzman, M. G., G. Kouri, J. Bravo, L. Valdes, S. Vazquez, and S. B. Halstead. 2002. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int.J.Infect.Dis.* 6:118-124.
7. Gubler, D. J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin.Microbiol.Rev.* 11:480-496.
8. Balmaseda, A., S. Saborio, Y. Tellez, J. C. Mercado, L. Perez, S. N. Hammond, C. Rocha, G. Kuan, and E. Harris. 2008. Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue diagnosis and epidemiological studies. *J.Clin.Virol.* 43:287-291.

9. Thein, S., M. M. Aung, T. N. Shwe, M. Aye, A. Zaw, K. Aye, K. M. Aye, and J. Aaskov. 1997. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 56:566-572.
10. Rodriguez-Madoz, J. R., D. Bernal-Rubio, D. Kaminski, K. Boyd, and A. Fernandez-Sesma. 2010. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. *J.Virol.* 84:4845-4850.
11. Chen, Y. C. and S. Y. Wang. 2002. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J.Virol.* 76:9877-9887.
12. Couvelard, A., P. Marianneau, C. Bedel, M. T. Drouet, F. Vachon, D. Henin, and V. Deubel. 1999. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum.Pathol.* 30:1106-1110.
13. Jessie, K., M. Y. Fong, S. Devi, S. K. Lam, and K. T. Wong. 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J.Infect.Dis.* 189:1411-1418.
14. Kurane, I. 2007. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.* 30:329-340.
15. Bozza, F. A., O. G. Cruz, S. M. Zagne, E. L. Azeredo, R. M. Nogueira, E. F. Assis, P. T. Bozza, and C. F. Kubelka. 2008. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC.Infect.Dis.* 8:86.:86.

16. Godfrey, D. I. and M. Kronenberg. 2004. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J.Clin.Invest.* 114:1379-1388.
17. Van Kaer, L. and S. Joyce. 2005. Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr.Biol.* 15:R429-R431.
18. Bendelac, A., P. B. Savage, and L. Teyton. 2007. The biology of NKT cells. *Annu.Rev.Immunol.* 25:297-336.:297-336.
19. Barral, D. C. and M. B. Brenner. 2007. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat.Rev.Immunol.* 7:929-941.
20. Cohen, N. R., S. Garg, and M. B. Brenner. 2009. Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. *Adv.Immunol.* 102:1-94.:1-94.
21. Venkataswamy, M. M. and S. A. Porcelli. 2010. Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells. *Semin.Immunol.* 22:68-78.
22. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, and M. Taniguchi. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science.* 278:1626-1629.
23. Cerundolo, V., J. D. Silk, S. H. Masri, and M. Salio. 2009. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat.Rev.Immunol.* 9:28-38.
24. Skold, M. and S. M. Behar. 2003. Role of CD1d-restricted NKT cells in microbial immunity. *Infect.Immun.* 71:5447-5455.

25. Tessmer, M. S., A. Fatima, C. Paget, F. Trottein, and L. Brossay. 2009. NKT cell immune responses to viral infection. *Expert.Opin.Ther.Targets*. 13:153-162.
26. Brigl, M. and M. B. Brenner. 2010. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Semin.Immunol*. 22:79-86.
27. Shresta, S., J. L. Kyle, H. M. Snider, M. Basavapatna, P. R. Beatty, and E. Harris. 2004. 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*. 78:2701-2710.
28. Atrasheuskaya, A., P. Petzelbauer, T. M. Fredeking, and G. Ignatyev. 2003. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol.Med.Microbiol*. 35:33-42.
29. Assuncao-Miranda, I., F. A. Amaral, F. A. Bozza, C. T. Fagundes, L. P. Sousa, D. G. Souza, P. Pacheco, G. Barbosa-Lima, R. N. Gomes, P. T. Bozza, A. T. Da Poian, M. M. Teixeira, and M. T. Bozza. 2010. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J*. 24:218-228.
30. Atrasheuskaya, A., P. Petzelbauer, T. M. Fredeking, and G. Ignatyev. 2003. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol.Med.Microbiol*. 35:33-42.
31. Chiba, A., C. C. Dascher, G. S. Besra, and M. B. Brenner. 2008. Rapid NKT cell responses are self-terminating during the course of microbial infection. *J.Immunol*. 181:2292-2302.

32. Kim, S., S. Lalani, V. V. Parekh, T. L. Vincent, L. Wu, and L. Van Kaer. 2008. Impact of bacteria on the phenotype, functions, and therapeutic activities of invariant NKT cells in mice. *J.Clin.Invest.* 118:2301-2315.
33. Parekh, V. V., M. T. Wilson, and L. Van Kaer. 2005. iNKT-cell responses to glycolipids. *Crit Rev.Immunol.* 25:183-213.
34. Souza, D. G., C. T. Fagundes, L. P. Sousa, F. A. Amaral, R. S. Souza, A. L. Souza, E. G. Kroon, D. Sachs, F. Q. Cunha, E. Bukin, A. Atrasheuskaya, G. Ignatyev, and M. M. Teixeira. 2009. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106:14138-14143.
35. Juffrie, M., G. M. Der Meer, C. E. Hack, K. Haasnoot, Sutaryo, A. J. Veerman, and L. G. Thijs. 2000. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect.Immun.* 68:702-707.
36. Chau, T. N., N. T. Quyen, T. T. Thuy, N. M. Tuan, D. M. Hoang, N. T. Dung, I. B. Lien, N. T. Quy, N. T. Hieu, L. T. Hieu, T. T. Hien, N. T. Hung, J. Farrar, and C. P. Simmons. 2008. Dengue in Vietnamese infants--results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *J.Infect.Dis.* 198:516-524.
37. Liu, C. C., K. J. Huang, Y. S. Lin, T. M. Yeh, H. S. Liu, and H. Y. Lei. 2002. Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. *J.Med.Virol.* 68:241-252.
38. Van Dommelen, S. L. and M. A. Degli-Esposti. 2004. NKT cells and viral immunity. *Immunol.Cell Biol.* 82:332-341.

39. Gould, E. A. and T. Solomon. 2008. Pathogenic flaviviruses. *Lancet*. 371:500-509.
40. Gyure, K. A. 2009. West Nile virus infections. *J.Neuropathol.Exp.Neurol*. 68:1053-1060.
41. Suthar, M. S., M. Gale, Jr., and D. M. Owen. 2009. Evasion and disruption of innate immune signalling by hepatitis C and West Nile viruses. *Cell Microbiol*. 11:880-888.
42. Maximova, O. A., L. J. Faucette, J. M. Ward, B. R. Murphy, and A. G. Pletnev. 2009. Cellular inflammatory response to flaviviruses in the central nervous system of a primate host. *J.Histochem.Cytochem*. 57:973-989.
43. Diamond, M. S. 2009. Mechanisms of evasion of the type I interferon antiviral response by flaviviruses. *J.Interferon Cytokine Res*. 29:521-530.
44. Sampath, A. and R. Padmanabhan. 2009. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res*. 81:6-15.
45. Toyabe, S., S. Seki, T. Iiai, K. Takeda, K. Shirai, H. Watanabe, H. Hiraide, M. Uchiyama, and T. Abo. 1997. Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J.Immunol*. 159:1537-1542.
46. Takeda, K., Y. Hayakawa, L. Van Kaer, H. Matsuda, H. Yagita, and K. Okumura. 2000. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 97:5498-5503.
47. Nagarajan, N. A. and M. Kronenberg. 2007. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J.Immunol*. 178:2706-2713.

48. Hu, C. K., F. Venet, D. S. Heffernan, Y. L. Wang, B. Horner, X. Huang, C. S. Chung, S. H. Gregory, and A. Ayala. 2009. The role of hepatic invariant NKT cells in systemic/local inflammation and mortality during polymicrobial septic shock. *J.Immunol.* 182:2467-2475.
49. Iwakura, Y., S. Nakae, S. Saijo, and H. Ishigame. 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol.Rev.* 226:57-79.:57-79.
50. Kolls, J. K. and A. Linden. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 21:467-476.
51. Cornish, A. L., R. Keating, K. Kyparissoudis, M. J. Smyth, F. R. Carbone, and D. I. Godfrey. 2006. NKT cells are not critical for HSV-1 disease resolution. *Immunol.Cell Biol.* 84:13-19.
52. Van Dommelen, S. L., H. A. Tabarias, M. J. Smyth, and M. A. Degli-Esposti. 2003. Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J.Virol.* 77:1877-1884.
53. Kamau, E., R. Takhampunya, T. Li, E. Kelly, K. K. Peachman, J. A. Lynch, P. Sun, and D. R. Palmer. 2009. Dengue virus infection promotes translocation of high mobility group box 1 protein from the nucleus to the cytosol in dendritic cells, upregulates cytokine production and modulates virus replication. *J.Gen.Virol.* 90:1827-1835.
54. Lin, Y. W., K. J. Wang, H. Y. Lei, Y. S. Lin, T. M. Yeh, H. S. Liu, C. C. Liu, and S. H. Chen. 2002. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J.Virol.* 76:12242-12249.



55. Mangada, M. M. and A. L. Rothman. 2005. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J.Immunol.* 175:2676-2683.
56. Shresta, S., K. L. Sharar, D. M. Prigozhin, H. M. Snider, P. R. Beatty, and E. Harris. 2005. Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J.Immunol.* 175:3946-3954.
57. Azeredo, E. L., L. M. Oliveira-Pinto, S. M. Zagne, D. I. Cerqueira, R. M. Nogueira, and C. F. Kubelka. 2006. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin.Exp.Immunol.* 143:345-356.
58. Green, S., S. Pichyangkul, D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Nimmannitya, A. Nisalak, I. Kurane, A. L. Rothman, and F. A. Ennis. 1999. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J.Infect.Dis.* 180:1429-1435.
59. Kurane, I., D. Hebblewaite, W. E. Brandt, and F. A. Ennis. 1984. Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J.Virol.* 52:223-230.

## **Acknowledgements**

We acknowledge the generous support from the NIAID Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, GA) for supplying CD1d tetramers. We gratefully acknowledge Drs T. Nakayama and M. Taniguchi (RIKEN Institute, Yokohama, Japan) for the gift of J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> C57BL/6 mice. The authors would like to thank I. Maillet, L. Fauconnier (CNRS UMR 6218, Orléans) and C. Vendeville (CIIL, Institut Pasteur de Lille) for their technical assistance.

## **Disclosures**

The authors have no financial conflict of interest.

## Footnotes

<sup>1</sup>This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the CNRS, the University of Lille Nord de France, the Pasteur Institute of Lille, the French national Research Agency (ANR), under reference ANR-08-MIEN-R08066ES/RPV08036ESA and from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). RG, REMPS and SI were recipients of a doctoral fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et Technique, respectively. JR was supported by a postdoctoral fellowship from the ANR. CF is supported by Inserm and BR and FT by the CNRS.

<sup>2</sup>Address correspondence and reprint requests to Dr. François Trottein,, Center for Infection and Immunity of Lille, Inserm U1019-CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France. E-mail: francois.trottein@pasteur-lille.fr.

<sup>3</sup>Abbreviations used in this paper: DV, dengue virus ; DCs, dendritic cells; NK, natural killer; iNKT, invariant NKT;  $\alpha$ -GalCer,  $\alpha$ -galactosylceramide; WT, wild type; LD, lethal dose; PFU, plaque forming unit; H&E, hematoxylin and eosin ; p.i., post-infection.

## Figure Legends

**Figure 1. Activation of iNKT cells during the course of DV infection.** *A*, iNKT cell frequency and CD69 expression on iNKT cells during DV infection. Mice were inoculated with a lethal dose (30 LD<sub>50</sub>) of DV and splenic iNKT cells were analyzed 3 and 5 days p.i. *Upper panels* represent the percentages of gated PBS-57-loaded CD1d tetramer<sup>+</sup> TCRβ<sup>+</sup> (iNKT) cells in mock-treated or DV-infected mice, 3 days and 5 days p.i. Representative dot plots are shown. *Lower panels* show the expression of CD69 on the surface of iNKT cells and CD5<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup> (NK) cells. The histogram overlay represents the expression of CD69 on gated iNKT cells from either mock-treated or DV-infected 3 days or 5 days p.i. The bar histograms represent the mean expression of CD69 (MFI) on iNKT and NK cells. Data represent the mean MFI ± SEM (n = 3). Significant differences are designated by using the two-tailed Student's t-test, \*\* p < 0.01. *B*, Analysis of *ex vivo* cytokine production by iNKT cells 3 and 5 days p.i.. Gated iNKT and NK cells were analyzed for intracellular IFN-γ production. Gates were set based on the isotype control. Representative dot plots are shown. The percentages of iNKT or NK cells positive for IFN-γ are represented on the bar histograms. Data represent the mean percentages ± SEM (n = 3-10). Significant differences are designated by using the two-tailed Student's t-test, \*\*\* p < 0.001.

**Figure 2. Variation of body weight and survival rates in WT and iNKT cell-deficient mice infected with a lethal dose of DV.** *A*, Age-matched WT or Jα18<sup>-/-</sup> mice were infected with a lethal dose (30 LD<sub>50</sub>) of DV and then followed for mortality and weighted daily. *Left panel*, body weight loss expressed as a percentage of the animal's initial weight. *Right panel*, percentages of survival (n = 10-25, at least two independent experiments). Log-rank test for comparisons of Kaplan-Meier survival curves indicated a significant increase in the mortality of WT mice compared to Jα18<sup>-/-</sup> animals, p < 0.01. *B*, Weight loss and survival rate of

J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice reconstituted or not with iNKT cells. J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice were i.v. injected with either 1 x 10<sup>6</sup> cell-sorted iNKT cells or PBS 18 hours before DV challenge. *Left panel*, body weight loss expressed as a percentage of the animal's initial weight. *Right panel*, the survival of reconstituted J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice was monitored and compared to WT mice (n = 10/group, two independent experiments). Log-rank test for comparisons of Kaplan-Meier survival curves indicated a significant increase in the mortality of J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice reconstituted with iNKT cells compared to J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> animals, \* p = 0.0291.

**Figure 3. Analysis of the pathology in WT and iNKT cell-deficient mice infected with a lethal dose of DV.** A, Blood from mock-treated or DV-infected WT and J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice were collected 5 days p.i. and analyzed for haematology parameters. The number of platelets is shown as number x 10<sup>3</sup>/ $\mu$ l of blood. Granulocytes, monocytes and lymphocytes are shown as percentages. B, Serum from mock-treated or DV-infected mice was collected at day 5 p.i. and levels of IL-6 and IFN- $\gamma$  were measured by ELISA. A and B, Data represent the mean  $\pm$  SEM (n = 6-11 mice/group, at least two independent experiments). Significant differences are designated by using the two-tailed Student's t-test, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001. C, Representative pictures of H&E-stained liver sections of mock-treated and DV-infected mice 6 days after inoculation.

**Figure 4. Analysis of the inflammatory cytokine response in WT and iNKT cell-deficient mice infected with a lethal dose of DV.** Spleens from DV-infected WT and J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice were collected at days 4, 5 and 6 p.i.. Tissues were homogenized and the concentrations of IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-12 p40 and CXCL-1/KC were analyzed by ELISA. Values represent the mean  $\pm$  SEM (n = 4-8, two independent experiments). Significant differences between groups are designated by using the two-tailed Student's t-test, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

**Figure 5. Analysis of NK cell, neutrophil and T lymphocyte frequencies and activation in infected WT and iNKT cell-deficient mice.** Five days p.i., splenocytes from infected mice were recovered and analyzed for NK cell, neutrophil and T cell frequencies and activation status. *A*, The average percentages  $\pm$  SEM of gated CD5<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup> cells from mock and infected WT or J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice are shown (*upper left panel*). NK cells were also analyzed for cell surface CD69 expression (mean MFI  $\pm$  SEM) (*upper right panel*) and intracellular granzyme B and IFN- $\gamma$  expression (mean % positive cells  $\pm$  SEM) (*lower panels*). *B*, The frequency  $\pm$  SEM of CD11c<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> cells (neutrophils) and the expression of CD62-L (mean MFI  $\pm$  SEM) on gated neutrophils are shown. *C*, The mean percentages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells  $\pm$  SEM are shown in the *upper panels*. Expression of CD69 is represented in *lower panels* as mean MFI  $\pm$  SEM. *A-C*, Significant differences are designated by using the two-tailed Student's t-test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ( $n = 3-8$ , at least two independent experiments).

**Figure 6. Viral load in WT and iNKT cell-deficient mice infected with a lethal dose of DV.** Viral loads, as analyzed from infectious virus recovered from the liver and spleen of WT and J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice, were assessed at 6 days p.i. with 30 LD<sub>50</sub>. Data are shown as the log of PFU per 100 mg of tissue. Results are expressed as the geometric means and are representative of at least two experiments.

**Figure 1**

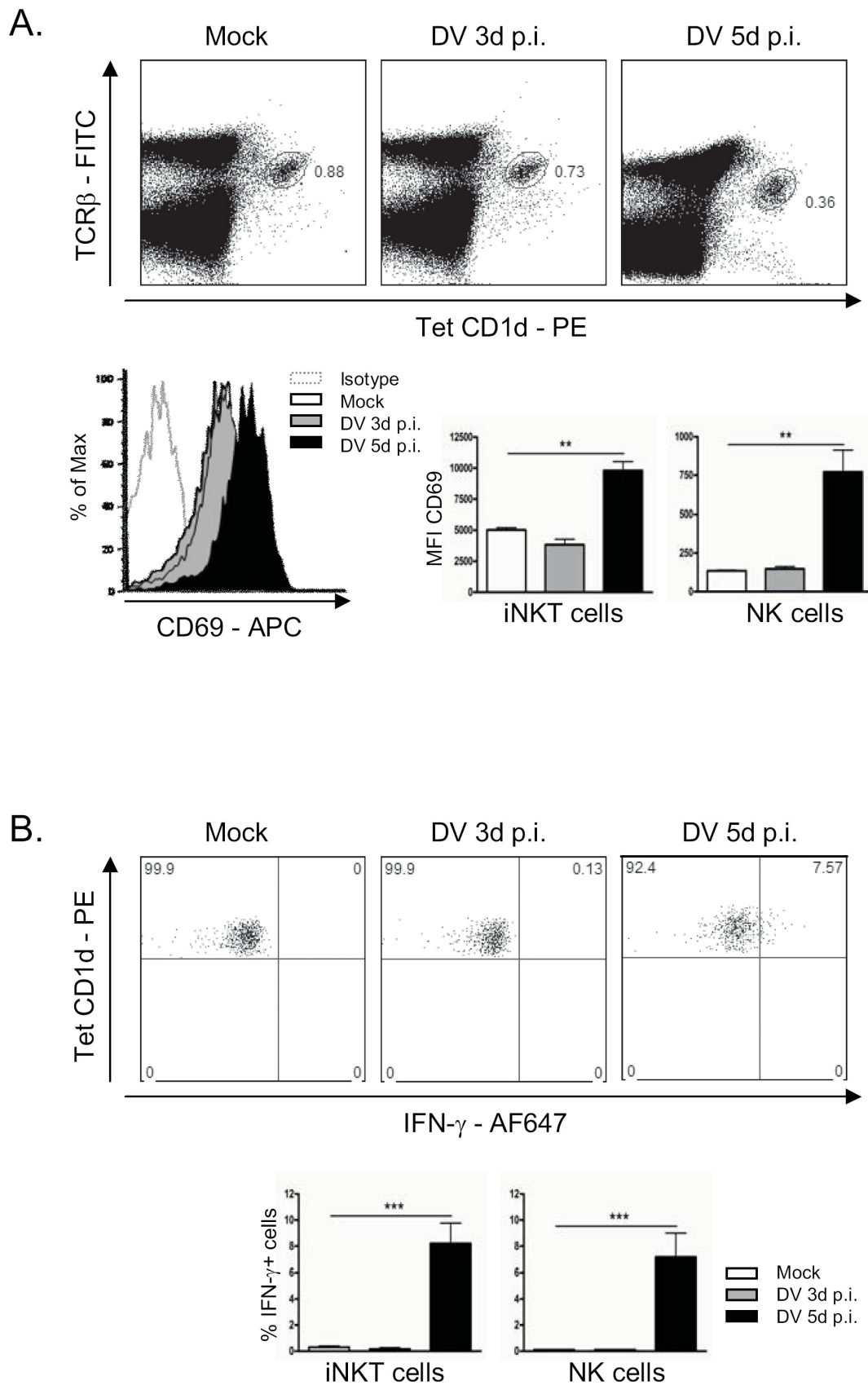
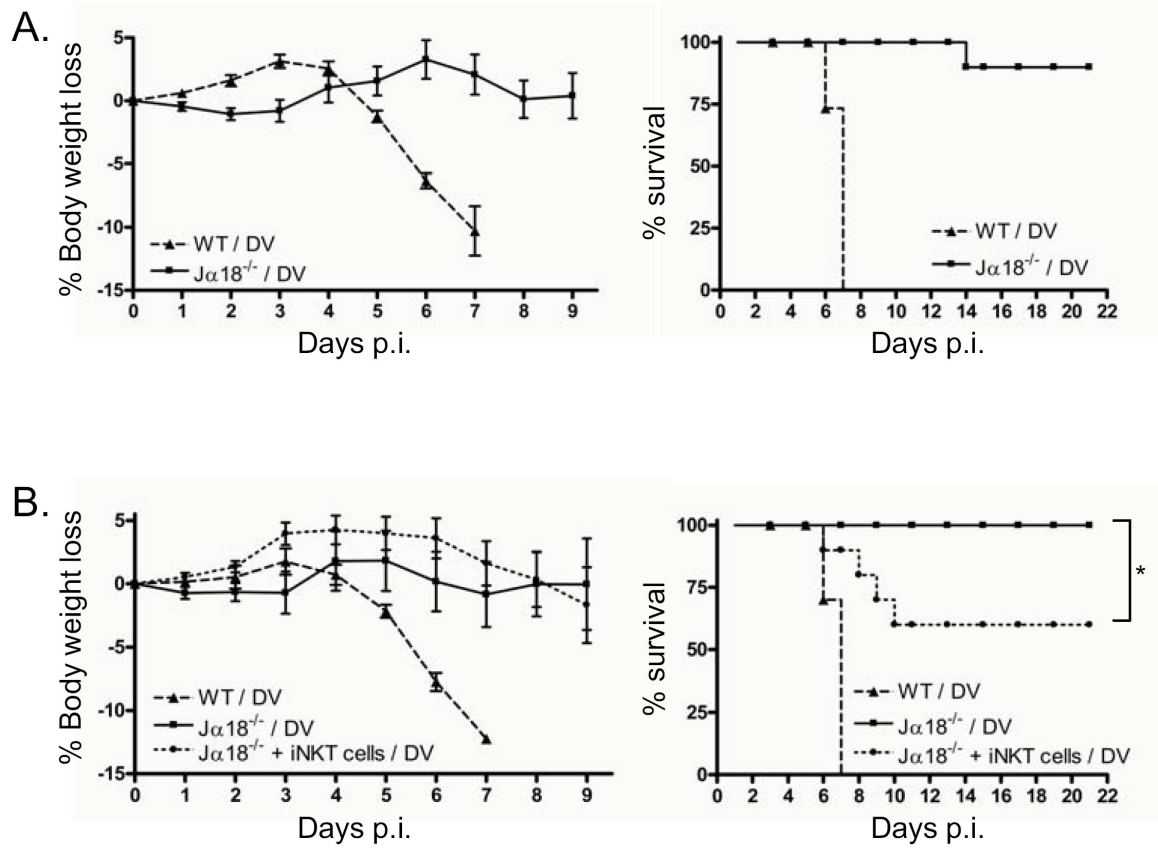


Figure 2





**Figure 3**

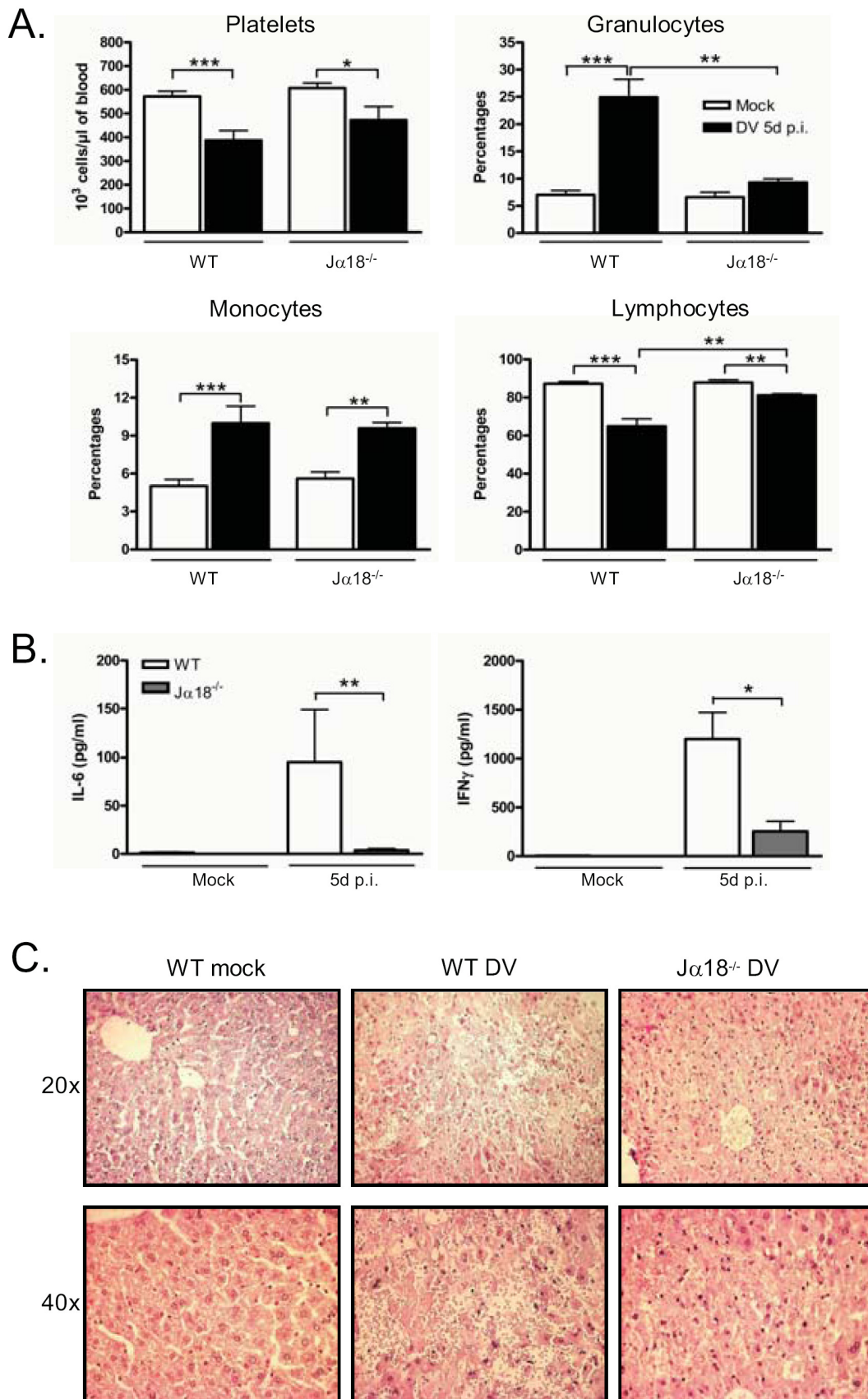
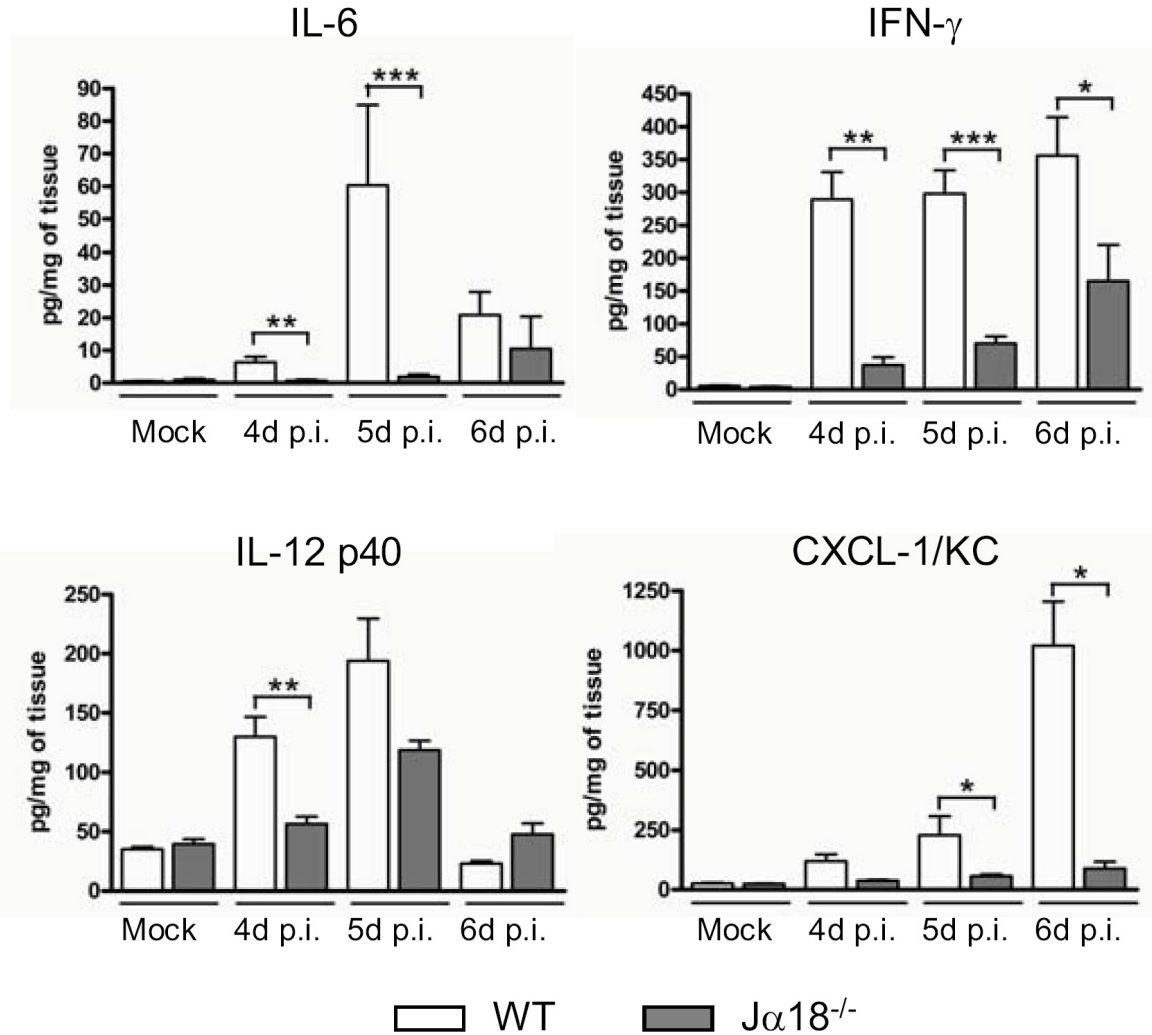


Figure 4



**Figure 5**

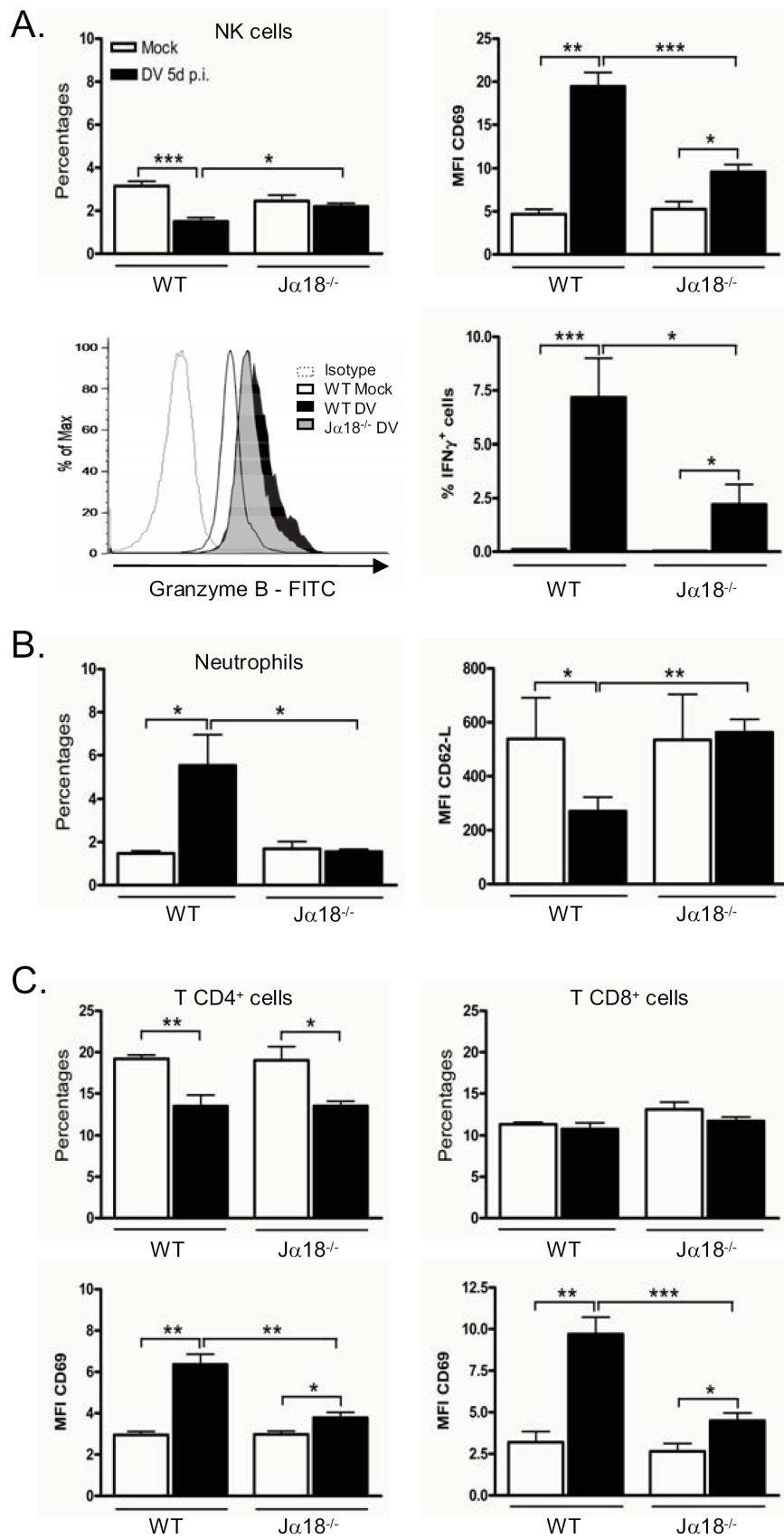


Figure 6

