

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**Mecanismos de Proteção *versus* Doença na
resposta do hospedeiro frente à infecção pelo
Dengue vírus em camundongos**

Vivian Vasconcelos Costa

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**Mecanismos de Proteção *versus* Doença na
resposta do hospedeiro frente à infecção pelo
Dengue vírus em camundongos**

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

Orientadora: Profa. Danielle da Glória de Souza
(Depto. de Microbiologia, ICB/UFMG)

Co-Orientador: Dr. Caio Tavares Fagundes
(Pós-doc na Universidade de Trinity College Dublin, Irlanda).

Aluna: Vivian Vasconcelos Costa

Belo Horizonte

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dani, minha orientadora, e acima de tudo uma grande amiga do coração. Agradeço a confiança em mim depositada, o respeito, o carinho, a dedicação e capacidade inspiradoras, a competência, o pulso firme nas horas firmes, e o colo amigo e acolhedor, SEMPRE! O meu muito obrigada por tudo!

Agradeço ao “Tio Flávio”, agora Prof. Flávio Amaral! Por cada ensinamento, cada experimento, cada conversa... Se hoje estou aqui é porque você me ajudou a chegar até aqui... E gratidão e respeito a gente leva pra sempre! Muito obrigada por tudo!

Agradeço ao Chefe! Prof. Mauro Teixeira! Uma das pessoas mais generosas que já conheci. Agradeço a confiança, o respeito e cada uma das oportunidades oferecidas! É admirável a capacidade que você tem de atrair o bem e as boas coisas. E é um prazer e uma alegria poder fazer parte disso!

Agradeço ao Caio a agradável e respeitosa companhia diária! Mesmo longe se faz tão perto e ainda assim faz tanta falta! Obrigada por cada ensinamento, cada experimento, cada discussão e acima de tudo pelo exemplo de respeito ao próximo!

Muitíssimo obrigada aos membros do Programa de Pós-graduação em Microbiologia pelo suporte, em especial aos professores pelos ensinamentos e ao secretário Douglas Nunes, pela eficiência e boa vontade diária. A CAPES, pelo apoio financeiro durante todo o doutorado, ao CNPq pela bolsa do CSf e oportunidade de crescimento fora do país e às demais agencias financiadoras FAPEMIG, INCT-Dengue (CNPq) e PRONEX, pelo suporte ao trabalho. Agradeço ainda, aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

Muito obrigada ao Professor Thiago Mattar Cunha (FMRP/USP, Ribeirão Preto) pelos ajuda com os animais $\mu\text{MT}^{-/-}$ e $\text{IL10}^{-/-}$. Ao professor, Waldiceu Verri Jr (Universidade Estadual do Paraná) pelos animais $\text{ST2}^{-/-}$. À Prof.a Leda Vieira do Depto de Bioquímica e Imunologia pelos camundongos deficientes em NOS2 , IL-18 e IL-4 . Ainda, agradeço ao Dr. Wouter Shul da NITD (Cingapura) e ao Prof. Jianzhu Chen do SMART (Cingapura) pela acolhida e oportunidade de conduzir experimentos em seus laboratórios.

O meu muito obrigado aos meus amigos e familiares que torceram e acreditaram que eu fosse chegar até aqui. Ao meu pai Cori pelo grande exemplo de trabalho durante toda vida. Por ser o meu Herói! A minha amada mãe, pelo amor e dedicação inspiradores. Pelo equilíbrio e por me dar o direito e a oportunidade de sonhar! Ao meu inigualável irmão e amigo Junior simplesmente por existir e ser o meu grande exemplo. À minha querida tia Sara e minha amada madrinha Fátima por todo o incentivo e carinho ao longo de minha vida. Aos grandes amigos Gerson e Valéria, Nádia e Regina, à Tia Sara, à Marina, e aos meus queridos sogros: Maria José e José Maria por me apoiarem em cada momento dessa importante caminhada. Em especial ao meu grande amor, Vinícius! Pelo incentivo, respeito, companheirismo, compreensão e exemplo de homem digno. A minha vida é muito mais completa depois que você chegou!

Agradeço aos grandes amigos que eu tive o prazer e a sorte de encontrar. Refiro-me à Ana Carol (flor), Luana (Lulu), Fer coelho (chuchuzinha), Flopes, Lucas Sechim (Lups), Celso (chuchu), Deborah (Dedé), Livinhas (pequenas), Lísia, Fatinha, Fred e Mila pela ajuda e conselhos dentro e fora do ambiente de trabalho. Ainda, agradeço à Deborah e Rebeca pela oportunidade de aprender ensinando. E aos colegas do grupo de dengue ainda não mencionados: Daniel, Fernando, Tiça, Thiago, Lucas K, Rafael Elias e Rodrigo pela ajuda direta ou indireta na condução dos experimentos. Aos colegas do

LIMHO: Lud (mais conhecida como cravo), Renata, Raquel, Talles, Paty Campi, Silvinha, Fer Ferraz, Rosana e tantos outros que tornaram o dia-a-dia no laboratório um ambiente tão respeitável e acolhedor. Aos colegas e professores do grupo IMUNOFAR; Tia nessa, Landa, Dani Bona, Lucas Kangussu, Fabiana, Gustavo, Tarcília, Angélica, Cris, Bráulio, Remo, Lucíola, Antônio Lúcio, Norinne, David, Marcinha, Marina, Pedro, Silvia Amaral, Luciana Tavares, Katita, Priscila, Albená, Alessandra, Bárbara, Fernando Lopes pela convivência saudável. Ainda, agradeço ao Ruiz Astigarraga pela imensa ajuda durante os ensaios de PRNT, ao Matheus pela ajuda com a purificação dos anticorpos e à Profa Milene com as análises histopatológicas. Em especial, agradeço a Ilma, Frank e Gil, pessoas tão queridas e sempre competentes. Agradeço também à Mirla e mais recentemente Tânia e Sirley pelo competente trabalho desempenhado.

Enfim, agradeço a todos, lembrados aqui ou não, pela colaboração neste trabalho.

RESUMO

A resposta imune do hospedeiro frente à infecção pelo dengue pode exercer tanto efeitos protetores quanto deletérios. Identificar quais mediadores estão associados a cada uma dessas condições pode representar uma nova oportunidade terapêutica para o tratamento da FHD/SCD. O objetivo desse trabalho foi estudar alguns mecanismos associados à proteção ou ao desenvolvimento de doença grave durante a infecção de camundongos pelo DENV e buscar identificar potenciais alvos terapêuticos que pudessem intervir com curso das manifestações mais graves associadas à doença. Mais especificamente desenvolvemos um novo modelo de infecção primária pelo DENV-3 que mimetiza muitos dos aspectos associados à doença grave vista em humanos. Ainda, validamos este modelo estudando o papel de mediadores conhecidamente associados à proteção do hospedeiro: a via de IL-12/IL-18, IFN- γ e NOS2 e os IFNs do tipo I. Em seguida, avaliamos o papel deletério associado à ativação do receptor B₂ de bradicinina durante o curso da infecção primária pelo DENV. A ativação desse receptor acarretou em manifestação agravada da doença e aumento da replicação viral, alterações que determinaram uma maior taxa de letalidade dos animais infectados. Demonstramos ainda que a resposta humoral desencadeada frente à infecção pelo DENV pode exercer um papel dual dependendo do contexto estudado. De fato, nossos dados mostram que células B são essenciais para a proteção do hospedeiro durante a infecção primária pelo DENV. Entretanto, no contexto da infecção secundária, a transferência passiva de anticorpos anti-DENV em níveis sub-neutralizantes num contexto que mimetiza as infecções secundárias, levaram à exacerbação da doença, via subversão das respostas antivirais inatas do hospedeiro e consequente aumento da replicação viral. Em acordo com esses achados, a administração de um *pool de* anticorpos humanos contendo doses

não neutralizantes de DENV também culminou em maior letalidade e agravamento da doença após a infecção pelo DENV. Finalizando, demonstramos que a administração de imunoglobulina em altas doses, acarretou em melhora de todos os parâmetros associados à doença sem interferir com a replicação viral em uma maneira dependente da produção de IL-33. Portanto, concluímos que interferir em vias imuno-inflamatórias associadas à doença podem representar potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da FHD/SCD sem que haja prejuízo no controle da infecção por parte do hospedeiro.

ABSTRACT

The host immune response against DENV infection may exert both protective and deleterious effects. Identifying which mediators are associated with each of these conditions may represent a new therapeutic opportunity for the treatment of DHF/DSS. The aim of this study was to investigate some mechanisms associated with protection or development of severe disease during infection of mice with DENV and also, to identify potential therapeutic targets that could interfere with the course of events associated with the more severe disease manifestation. More specifically, we developed a new model of primary infection with a DENV-3 strain that emulate many of the aspects seen in human disease. Still, we validated this model by studying the role of some mediators known to be associated with host protection against DENV: IL-12/IL-18, IFN- γ and NOS2 pathway and type I IFNs. We then evaluated the deleterious role associated with activation of bradykinin B₂ receptor during the course of primary infection with DENV. The activation of this receptor resulted in severe disease manifestation and increased viral replication, which was pivotal for the elevated mortality rates found in infected mice. We also demonstrated that the humoral immune responses unleashed during DENV infections may play a dual role depending on the context studied. Hence, our data show that B cells are essential for host protection during primary DENV infection; however, in a situation that mimics a secondary infection, sub-neutralizing anti-dengue-specific antibodies was associated with exacerbation of disease, via subversion of early host innate antiviral responses and consequent increase in viral replication. In agreement with these findings, administration of a pool of human antibodies containing non neutralizing DENV doses also resulted in higher mortality rates and more severe disease manifestation after infection with DENV. Finally, we demonstrate that administration of

IVIGs at high doses resulted in improvement in all disease parameters without interfering with viral replication in a manner dependent on the production of IL-33. We therefore conclude that interfering with the immune-inflammatory pathways associated with disease evolution may represent potential therapeutic targets for the treatment of DHF/DSS without any loss in control of the infection by the host.