

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia

TESE DE DOUTORADO

Mecanismos envolvendo ativação de receptores do tipo *toll9* e formação de espécies reativas na resistência do hospedeiro à infecção pelo vírus da Dengue

Thiago Vinicius Ávila

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

UFMG
Belo Horizonte
Agosto/2013

Thiago Vinicius Ávila

**Mecanismos envolvendo ativação de
receptores do tipo *toll9* e formação de espécies
reativas na resistência do hospedeiro à infecção
pelo vírus da Dengue**

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

UFMG

Belo Horizonte

Agosto/2013



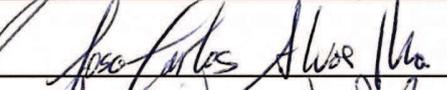
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 202 DE THIAGO VINÍCIUS ÁVILA

Às 09:00 horas do dia 14 do mês de agosto de 2013, na Sala Prof. Wilson Beraldo - Bloco A4 , departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Thiago Vinícius Ávila**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho**, USP/SP, **Dr. Alexandre de Magalhaes Vieira Machado**, Inst. René Rachou-FIOCRUZ/BH, **Profa. Dra. Lucíola da Silva Barcelos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**MECANISMOS ENVOLVENDO ATIVAÇÃO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL9 E FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS NA RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

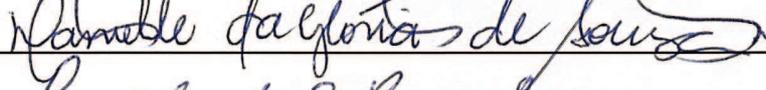
Belo Horizonte, 14 de agosto de 2013.

Assinatura dos membros da banca examinadora:









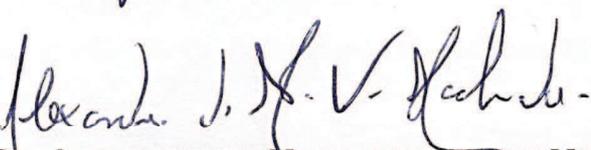


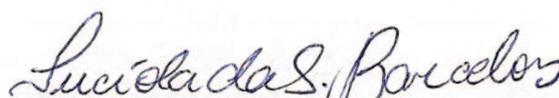
"MECANISMOS ENVOLVENDO ATIVAÇÃO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL9 E FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS NA RESISTÊNCIA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE"

THIAGO VINÍCIUS ÁVILA

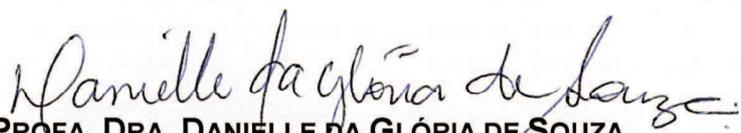
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 14 de agosto de 2013, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROF. DR. JOSÉ CARLOS FARIAS ALVES FILHO
USP/SP


DR. ALEXANDRE DE MAGALHAES VIEIRA MACHADO
INST. RENÉ RACHOU-FIOCRUZ/BH


PROFA. DRA. LUCÍOLA DA SILVA BARCELOS
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROF. DR. JÔNATAS SANTOS ABRAHÃO
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DRA. DANIELLE DA GLÓRIA DE SOUZA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 14 de agosto de 2013

Dedico este trabalho aos meus amados pais, José Geraldo e Maria Auxiliadora, aos meus queridos irmãos e a minha noiva e futura esposa Grazielly, minha companheira amada e incentivadora.

Tudo, aliás, é a ponta de um mistério. Inclusive, os fatos. Ou a ausência deles.

Duvida? Quando nada acontece, há um milagre que não estamos vendo.

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças e competência para realizar este trabalho. Pela coragem nos desafios e nas dificuldades; pela paz na tranquilidade e na turbulência; pela esperança nas descobertas e no desconhecido; pela inspiração na ciência e na fé.

Aos meus amados pais José Geraldo e Maria Auxiliadora por nunca terem medido forças para que hoje eu me tornasse quem eu sou; pelo exemplo de respeito e perseverança; por sempre me apoiarem e intercederem por mim. Aos meus queridos irmãos e cunhados: Gláucia, Ronaldo, Alexandre e Silvânia, por todo apoio e torcida.

A minha amada noiva Grazielly, a quem devo a minha gratidão por todo apoio, afeto, conselhos e cumplicidade. Por ser minha confidente; minha melhor amiga e minha companheira em todas as horas. Obrigado por fazer parte dos meus sonhos e permitir que eu fizesse parte dos seus.

A querida Dani, minha orientadora e amiga por ter me recebido no laboratório de interação microrganismo-hospedeiro (LIMHO) e no grupo Imunofar de braços abertos e pela confiança e oportunidades dadas a mim nesses anos. Agradeço ainda por me ter proporcionado toda a condição para realizar este trabalho, pelas boas conversas, amizade e, sobretudo, pela sua orientação me indicando sempre o melhor caminho a seguir.

Ao estimado chefe Mauro Martins Teixeira por ter me recebido tão bem no grupo Imunofar, por nunca ter negado esforços para a concretização desse trabalho,

pela sua orientação efetiva nos momentos de impossibilidade da Dani e pela ajuda em todos os sentidos. Agradeço ainda pelas oportunidades a mim dadas e pela confiança e amizade.

Aos membros do programa de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia desta Universidade pelo suporte, em especial aos professores pelos ensinamentos e as secretárias Cintya e Nilda pelas orientações quanto aos assuntos burocráticos. Agradeço ainda aos componentes da banca examinadora pelo aceite do convite, interesse e disponibilidade em avaliar este trabalho.

Ao Dr. Bernhard Ryffel e Valérie Quesniaux por me receberem em seu laboratório no “Centre national de la recherche scientifique (CNRS)” em Orléans, França, e por todo apoio durante meu período de estágio em seu país. As técnicas do CNRS, Isabelle Maillet e Léa Braut pela ajuda na condução dos experimentos e pedidos dos animais. Agradeço de maneira especial ao Nicolas e a Norinne pelas aulas de francês e por terem me recebido tão bem durante a minha estadia na França.

A Prof^ª. Leda Vieira do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG por nos ter cedido gentilmente os camundongos deficientes em IFN- γ , NOS2 e gp91^{phox} ; ao Dr. Alexandre M. Vieira Machado do Instituto René Rachou – FIOCRUZ, BH, por nos ter cedido gentilmente camundongos deficientes em TLR9, e ao Prof. Thiago Mattar Cunha (FMRP/USP, Ribeirão Preto) por nos ter enviado gentilmente o catalisador da decomposição de Peroxinitrito (FeTPPs).

Ao INCT em dengue, ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro durante todo o período de doutorado e em especial ao INCT em Dengue pelo incentivo financeiro durante minha permanência na França proporcionando a mim uma oportunidade ímpar de crescimento profissional. Ainda, as demais agências de fomento FAPEMIG e PRONEX, pelo suporte ao trabalho.

A Fernanda Ferraz e ao Flopes pela torcida de sempre, pelas boas conversas e pela amizade. Fer, obrigado pela disponibilidade, pela ajuda durante a condução dos experimentos e seu empenho nas revisões, estatísticas e na composição dos textos.

Ao grupo de estudo em Dengue, em especial ao Caio e Vivian pela parceria que tivemos nestes anos; por terem me apresentado às técnicas de bancada quando eu iniciei no laboratório e pela ajuda na composição dos trabalhos. Obrigado pelas correções de textos, arte final e pelas boas discussões sobre ciência. Agradeço também a ambos pela oportunidade de podermos trabalhar juntos, contribuindo nos trabalhos uns dos outros e dessa forma avançando no conhecimento científico. Agradeço ainda a Luana, Rebecca, Déborah e Daniel Cisalpino pelo interesse em nos ajudar sempre, principalmente nos experimentos in vitro e RT-PCR. Ainda, ao Rafael Elias, Ana Carol, Fernando e Patrícia Souza por toda a ajuda e disponibilidade quando precisamos.

Aos colegas do LIMHO, atuais ou que já passaram pelo laboratório: Profa. Patrícia Cisalpino, Profa. Sueli, Mila, Lívia Resende, Lívia Tavares, Renata, Zélia, Celso, Ludmila, Rosana, Marina, Marco Aurélio, Patrícia Campi, Lucas e Silvia. Em especial agradeço ao Talles, Raquel, Andréia e Thaís pela disposição e ajuda nos experimentos in vivo e técnicas histológicas no início ou no fim do meu doutorado.

Aos colegas e professores do grupo IMUNOFAR: Prof^a Vanessa, Prof. Flávio, Prof. Gustavo, Prof. Fred, Prof^a. Dani Bona, Prof. Antônio Lúcio, Prof. Remo, Prof^a. Landa, Prof^a. Fabiana, Prof^a. Tarcília, Priscila, Bárbara, Denise, Albená, Alessandra, Angélica, Cris, Aline, Natália, Kátia, Livia Barroso, Bráulio, Pedro, Silvia Amaral, Lísia, Fatinha, Andréia e Luanny. Ainda, agradeço a Gil, Frank, Ilma, Fernanda Rocha, Mirla, Sirley e Tânia pela disposição e competência.

E por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

RESUMO

Atualmente, a dengue é uma das mais importantes arbovirose que afeta o homem e constitui um sério problema de saúde mundial. A doença é causada pelo *Dengue virus* que se divide em quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). A doença pode manifestar-se de duas maneiras distintas: a forma clássica e a febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue. A instalação de uma resposta inflamatória anômala, com liberação em massa de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas parece estar envolvida na progressão da forma clássica para as formas mais graves da doença, porém muitas desses componentes parecem também ser essenciais ao controle da infecção. Neste trabalho verificamos que mesmo na dengue clássica há a instalação de um processo inflamatório sistêmico seguido de morte celular e liberação de DNA mitocondrial na circulação. Esse processo parece favorecer a ativação de TLR9 durante a infecção pelo DENV-3, culminando na indução de IFN-I, IL-1 β . Além disso, vias que induzem a produção de IFN- γ são ativadas com consequente geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Aqui, elucidamos um mecanismo mais abrangente pelo qual IFN- γ exerce seus efeitos durante a infecção pelo DENV: a regulação positiva da expressão de gp91^{phox} com consequente produção de superóxido. Durante a doença, o superóxido deve reagir com NO resultando em ONOO⁻, exercendo uma ação antiviral mais efetiva. Dessa forma, a interação vírus-hospedeiro gera uma sequência de processos, onde a replicação viral é rapidamente controlada, em parte, por processos envolvendo inflamação e morte celular com consequente liberação de DNA mitocondrial, ativação de TLR9 e produção de espécies reativas. A ação de ONOO⁻, somada a ativação de TLR9 parecem ser os principais mecanismos pelos quais o hospedeiro resiste a infecção e contém a progressão da doença durante a infecção pelo vírus da dengue.

Palavras-chave: Dengue, TLR9, Interferon, Superóxido, Óxido nítrico, Peroxinitrito.

ABSTRACT

Dengue is one of the most important arboviruses that affect humans and it is a serious global health problem. The disease is caused by dengue virus which is divided into four serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). The disease usually manifests in two forms: the classic fever and the dengue hemorrhagic fever / dengue shock syndrome. The installation of an abnormal inflammatory response and mass release of proinflammatory cytokines and reactive species appears to be involved in the progression of classic disease to the more severe forms of the disease, but many of these components also seem to be essential for controlling the infection. In this work, we found that even in dengue fever, there is a systemical inflammatory process installed followed by cell death and mitochondrial DNA release in serum. This process could lead the activation of its putative receptor TLR9 during infection by DENV-3, resulting in the induction of IFN-I and IL-1 β . Additionally, pathways that induce the production of IFN- γ are activated with consequent generation of reactive oxygen and nitrogen species. Here, we elucidated a more comprehensive effect for IFN- γ to exert its effects during infection by DENV: the upregulation of the expression of gp91^{phox} with consequent production of superoxide. During the illness, superoxide should react with NO, resulting in ONOO⁻, to exert a more effective antiviral action. Thus, the virus-host interaction generates a sequence of processes, by which viral replication should be rapidly controlled, in part, by processes involving inflammation and cell death with consequent release of mitochondrial DNA, TLR9 activation and production of reactive species. The actions of ONOO⁻ and the activation of TLR9 seem to be the main mechanisms by which the host resists to infection and contains the disease progression during dengue.

Keywords: Dengue, TLR9, Interferon, superoxide, nitric oxide, peroxynitrite.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS (Conforme aparecem no texto)

DENV – *Dengue virus*

RNA – *Ribonucleic acid*

(+)ssRNA - *positive-sense single-stranded RNA*

NS – *Nonstructural protein*

DSS – *dengue shock syndrome*

ADE - *Antibody-dependent enhancement*

IL - *Interleucina*

CXCL - *Chemokine (C-X-C motif) ligand*

TNF- α – *Fator de necrose tumoral alfa*

IFN – *Interferon*

Th – *T helper*

CCL - *Chemokine ligands*

MCP - *monocyte chemotactic protein*

PTX-3 - *Pentraxin 3*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

PAMP - *Pathogen-associated molecular pattern*

DAMP – *Damage-associated molecular pattern*

TLR – *Toll like receptor*

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response gene (88)*

IRF - *Interferon regulatory transcription factor*

NF- κ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

IRAK - *Interleukin-1 receptor-associated kinase*

IKK - *I κ B kinase*

TRAF - *TNF receptor-associated factor*

OPN-I- *Osteopontin-I*

IFNAR - *Interferon-alpha/beta receptor*

JAK – *Janus Kinase*

STAT - *Signal Transducer and Activator of Transcription*

Tyk - *Tyrosine kinase*

PKR - *Protein kinase R*

NO₂ – *nitrito*

NO₂⁻ - *ânion nitrito*

NO_3^- - ânion nitrato
 N_2O_3 - trióxido de dinitrogênio
gp91^{phox} - *glycoprotein 91 phagocyte oxidase*
NOX1 - *NADPH Oxidase 1*
NADPH-Oxidase - *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*
ICSBP - *Interferon consensus sequence-binding protein*
CYBB - *Cytochrome b beta*
p22^{phox} - *protein 22 phagocyte oxidase*
GAS - *Gamma interferon activation site*
PCR – *Polymerase chain reaction*
FeTPPs - *5,10,15,20-Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato Iron (III), Chloride*
LLC-MK2 - *Rhesus monkey kidney cell line*
SES-MG - *Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais*
RT-PCR - *Real-Time Quantitative Reverse Transcription*
ELISA - *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*
Ig - *Imunoglobulina*
MAC - *IgM antibody capture ELISA*
cDNA – *DNA complementar*
sTNFR - *Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor*
PBMC - *Peripheral blood mononuclear cell*
PBS - *Phosphate buffered saline*
HRP- *Horseradish peroxidase*
 H_2SO_4 – *Ácido sulfúrico*
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*
SFB – *Soro fetal bovino*
NADH deh - *Nicotineamide-adenine-dinucleotide dehydrogenase*
CETEA - *Comitê de ética em experimentação animal*
C57BL/6J – *C57 black Jax® 6*
PFU – *Plaque-forming unit*
i.p. – *intraperitoneal*
EDTA- *Ethylenediaminetetraacetate*
KI - *Dissociation Constant*
NaCl – *Cloreto de sódio*
 NaPO_4 – *Fosfato de sódio*

NaEDTA - *Tetrasodium-ethylenediaminetetraacetate*

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

M-MLV- *Moloney Murine Leukemia Virus*

18S – *18 Svedberg units*

TGO/ AST – Transaminase Oxalacética / aspartato aminotransferase

TGP/ALT - Transaminase Pirúvica / piruvato aminotransferase

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

p/v – peso por volume

DENV NS3 E1D8 - *NS3-specific monoclonal antibody E1D8*

MOI – *Multiplicity of infection*

SIN-1 - *3-morpholinopyrrolidine*

NPS – Nitroprussiato de sódio

HIV – *Human immunodeficiency virus*

HepG2 - *liver hepatocellular cells*

CpG DNA – *Methylated Deoxyribonucleic acid*

mRNA – RNA mensageiro

IL-1R - *Interleukin 1 receptor*

NLRP3 – *NOD-like receptor 3*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Revisão de Literatura	21
1.1.1. Contextualização e epidemiologia.....	21
1.1.2. Etiologia da Dengue	23
1.1.3. Transmissão e manutenção do vírus da Dengue.....	24
1.1.4. Ciclo de multiplicação do vírus da Dengue.....	26
1.1.5. Diagnóstico da infecção.....	34
1.1.6. Formas de manifestação da doença	36
1.1.7. Fisiopatologia da dengue hemorrágica	38
1.1.8. Teoria baseada na resposta imune do hospedeiro: “Intensificação dependente de anticorpos” (ADE) e outros eventos mediados por anticorpos.	39
1.1.9. A Resposta inflamatória e liberação de citocinas e produtos de morte celular durante a dengue.....	42
1.1.10. O papel da imunidade inata durante a Dengue	45
1.1.11. A ativação de TLR9 e a indução de IFN- γ	48
1.1.12. O papel de IFN- γ na indução de espécies reativas	52
1.1.13. Química das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: a geração de Peroxinitrito.....	54
1.2. Um novo modelo animal para o estudo da dengue e a possibilidade de novas perspectivas sobre a doença	56
1.3. Considerações sobre o estudo proposto	57
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL.....	59
2.1. Objetivo específico I.....	61
2.2. Objetivo específico II.....	62
2.3. Objetivo específico III	62
2.4. Objetivo específico IV	63

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.1. Voluntários e amostras.....	65
3.2. Extração de RNA viral e RT- PCR para detecção de dengue.....	66
3.3. Determinação dos níveis séricos e em sobrenadante de cultura de PBMC de marcadores imunológicos nas amostras humanas.....	67
3.4. Obtenção de células mononucleares.....	68
3.5. Cultura de células mononucleares	68
3.6. Dosagem de DNA mitocondrial no soro de pacientes com diagnóstico prévio de dengue e de camundongos infectados com DENV-3.....	69
3.7. Vírus.....	70
3.8. Animais e protocolos experimentais.....	70
3.9. Análise do índice de hematócrito.....	71
3.10. Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes.....	72
3.11. Determinação dos níveis de citocinas em tecidos animais	72
3.12. Dosagem de mieloperoxidase (MPO).....	74
3.13. Ensaio fluorimétrico	76
3.14. PCR em tempo real de genes murinos	76
3.15. Avaliação dos níveis das Transaminases Hepáticas no soro	77
3.16. Avaliação histopatológica.....	77
3.17. Titulação do vírus da Dengue	78
3.18. Imuno-histoquímica e quantificação de células NS3+	79
3.19. Ensaio de vírus.....	80
3.20. Análise estatística	81
4. RESULTADOS	82
4.1. Análise de IL-1 β , PTX-3, sTNFR1 e sTNFR2 no soro de pacientes com dengue.....	83
4.2. Análise de TNF- α , IL6, IL4, IL-10 e IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com dengue estimuladas com antígeno (proteína E)	85

4.3. Análise da concentração de DNA mitocondrial livre no soro como marcador da progressão da dengue em humanos	87
4.4. Participação de produtos originados de lesão celular na ativação de TLR9 durante a infecção por DENV-3	89
4.5. Geração de ROS e indução da expressão de gp91 ^{phox} durante a infecção pelo DENV-3	94
4.6. O complexo NADPH-Oxidase tem papel crucial durante a infecção pelo DENV-3	95
4.7. Papel de IFN- γ na regulação de gp91 ^{phox} e produção de espécies reativas durante a infecção pelo DENV-3.....	100
4.8. Efeito cooperativo entre o ânion superóxido e o óxido nítrico na resistência do hospedeiro à infecção pelo DENV-3.....	102
4.9. Geração de Peroxinitrito durante a infecção pelo DENV-3.....	109
4.10. Papel do Peroxinitrito durante a infecção pelo DENV-3.....	111
4.11. Ação antiviral do Peroxinitrito <i>in vitro</i>	115
5. <i>DISCUSSÃO</i>	117
6. <i>REFERÊNCIAS</i>	135

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO 1: Consenso global, risco e impacto da dengue em 2010	22
ILUSTRAÇÃO 2: A partícula viral	24
ILUSTRAÇÃO 3: Genoma do vírus da dengue	24
ILUSTRAÇÃO 4: Ciclo de transmissão e manutenção do vírus da dengue	26
ILUSTRAÇÃO 5: Representação esquemática do ciclo de vida do vírus da dengue ...	33
ILUSTRAÇÃO 6: Curso da infecção da dengue e tempo de diagnóstico	35
ILUSTRAÇÃO 7: Modelo de intensificação dependente de anticorpos na replicação do vírus da dengue.....	41
ILUSTRAÇÃO 8: Vias de sinalização de TLR9 e indução de IFN-I e outras citocinas inflamatórias	48
ILUSTRAÇÃO 9: Representação esquemática da ativação do receptor de IFN- γ pelo seu ligante e suas vias de sinalização	50
ILUSTRAÇÃO 10: Representação esquemática da regulação do gene que codifica a proteína p22 ^{phox} e gp91 ^{phox} por IFN- γ e suas vias de sinalização	54
ILUSTRAÇÃO 10: Casos notificados de dengue por semana epidemiológica em Minas Gerais, 2008 - 2010	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: IL-1 β e PTX-3 não são significativamente detectados na dengue clássica	84
FIGURA 2: Receptores solúveis de TNF são expressos no soro de pacientes febris: sTNFR-2 correlaciona-se à fase tardia da dengue	85
FIGURA 3: Proteína E viral induz a produção de IL-6 e TNF- α em PBMCs isolados de pacientes com dengue clássica	86
FIGURA 4: Níveis de DNA mitocondrial livre no soro são aumentados em pacientes febris e animais infectados com DENV-3	88
FIGURA 5: A ausência de TLR9 resulta em manifestação da doença mais grave após a infecção pelo DENV-3	91
FIGURA 6: A produção de IL-1 β e IFNs são comprometidas na ausência de TLR9 durante a dengue experimental	93
FIGURA 7: A expressão de gp91 ^{phox} e produção de ROS são aumentadas durante a dengue de maneira dependente de gp91 ^{phox}	94
FIGURA 8: A inibição da formação do complexo NADPH-Oxidase resulta na manifestação da doença mais grave após a infecção pelo DENV-3.....	97
FIGURA 9: O desenvolvimento de doença grave em animais com comprometimento na produção de superóxido é seguido por maior lesão hepática e aumento da carga viral após a infecção pelo DENV-3	100
FIGURA 10: A expressão de gp91 ^{phox} e a produção de ROS são regulados positivamente por IFN- γ após a infecção pelo DENV-3.....	101
FIGURA 11: O comprometimento concomitante da produção de NO e superóxido resulta no desenvolvimento precoce da doença grave de maneira similar a ausência de IFN- γ após a infecção por DENV-3	105

FIGURA 12: O desenvolvimento da doença grave precoce em animais comprometidos da produção concomitante de NO e superóxido está associado à maior lesão hepática e aumento da carga viral	108
FIGURA 13: A concomitante ausência de NOS2 e inibição do complexo NADPH-Oxidase resulta em maior prejuízo na geração de Peroxinitrito, de maneira semelhante à ausência de TLR9, após a infecção pelo DENV-3	110
FIGURA 14: A catalisação da decomposição de Peroxinitrito após a infecção pelo DENV-3 resulta na manifestação precoce da doença mais grave	113
FIGURA 15: O desenvolvimento da doença grave precoce em animais selvagens comprometidos de Peroxinitrito após a infecção pelo DENV-3 é seguido por maior lesão hepática e aumento da carga viral	114
FIGURA 16: O Peroxinitrito inibe a replicação do vírus da dengue	116
FIGURA 17: Representação esquemática dos mecanismos propostos envolvendo ativação de receptores do tipo <i>toll9</i> e formação de espécies reativas na resistência do hospedeiro à infecção pelo vírus da Dengue	134

1. INTRODUÇÃO

1.1. Revisão de Literatura

1.1.1. Contextualização e epidemiologia

A dengue é a mais importante arbovirose contemporânea que afeta o homem e constitui um grave problema de saúde pública mundial. Considerada uma doença tropical negligenciada, a dengue emergiu ao longo das quatro últimas décadas com inúmeras epidemias urbanas. (HOLMES & TWIDDY, 2003; SHRESTA *et al.*, 2004a; PANG *et al.*, 2007; KYLE & HARRIS, 2008; ST JOHN *et al.*, 2013; BHATT *et al.*, 2013). Essa expansão está intimamente relacionada ao crescimento da população humana, urbanização, globalização e à infeficácia no controle de seus mosquitos vetores, que se espalharam globalmente nos trópicos resultando em um aumento da magnitude das epidemias (ST JOHN *et al.*, 2013; BHATT *et al.*, 2013).

Estima-se que cerca de 230 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus da dengue no mundo resultando em 25.000 mortes predominantemente em crianças com menos de 15 anos de idade (WILDER-SMITH *et al.*, 2012; ST JOHN *et al.*, 2013). Atualmente, metade da população mundial está sob o risco de desenvolver a doença, totalizando mais de 100 países que se concentram em sua maioria nas áreas tropicais e subtropicais do globo (WILDER-SMITH *et al.*, 2012; ST JOHN *et al.*, 2013). Fazendo uso de abordagens cartográficas, BHATT e colaboradores, (2013) demonstraram que os números de casos podem ser ainda maiores se incluídos indivíduos assintomáticos, chegando a 390 milhões de infecções de dengue por ano, das quais apenas 96 milhões se manifestaram de maneira sintomática em qualquer nível de gravidade clínica ou subclínica. Esses dados reforçam a importância dos indivíduos assintomáticos na transmissão e manutenção do vírus. A ILUSTRAÇÃO 1 apresenta o consenso global, risco e impacto da dengue no ano de 2010 descrito por BHATT e colaboradores (2013).

No que diz respeito ao Brasil, o Ministério da saúde brasileiro registrou até a 12ª semana epidemiológica de 2013, um número total de 635.161 casos notificados de dengue no país. Destes, 1.243 casos se manifestaram sob a forma grave da doença, com 108 casos confirmados que evoluíram para o óbito (Ministério da Saúde, Brasil, 2013).

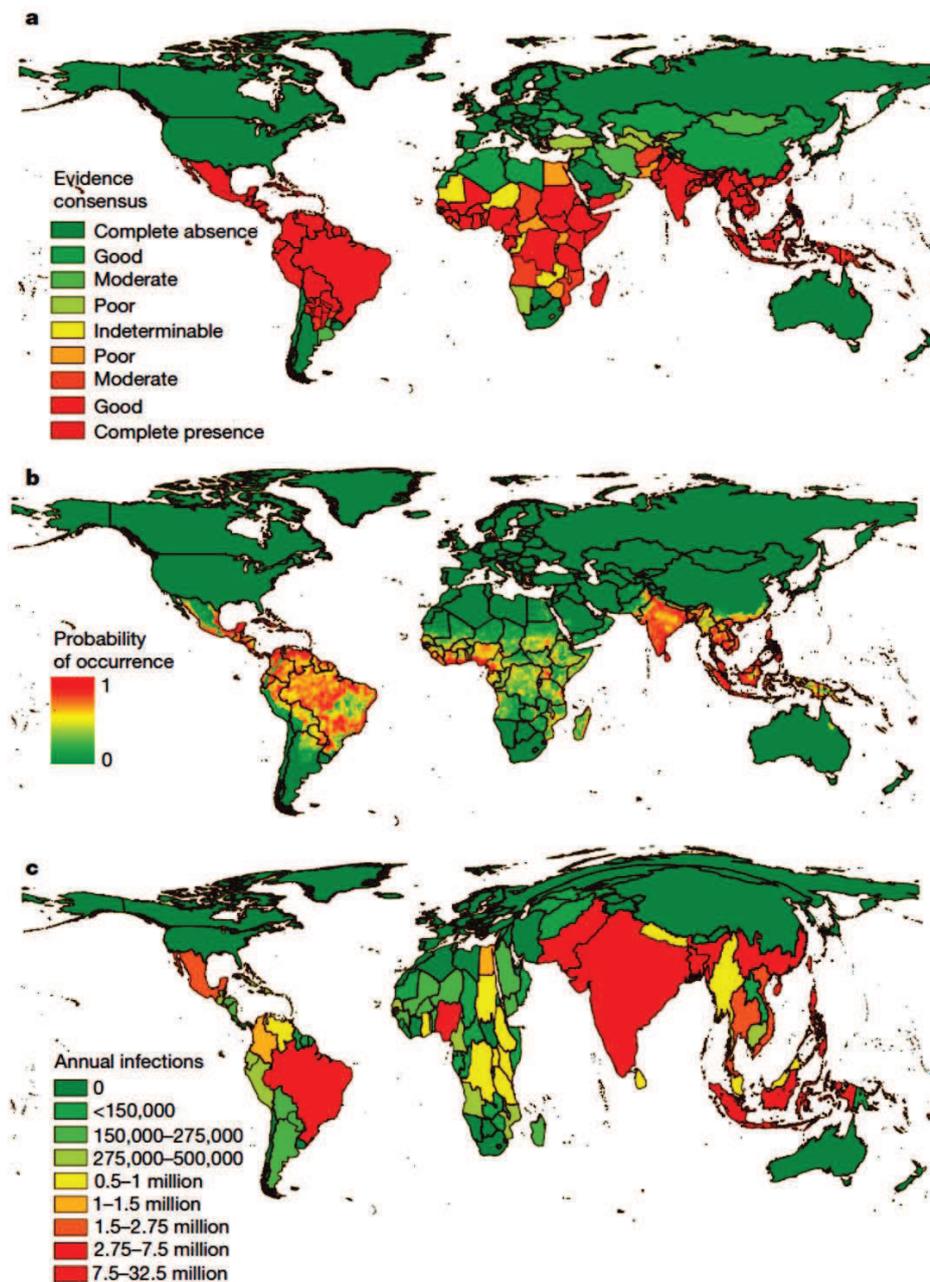


ILUSTRAÇÃO 1: Consenso global, risco e impacto da dengue em 2010. a) Evidências do consenso nacional e subnacional sobre a ausência completa (verde) e a presença completa (vermelho) da dengue. b) Probabilidade média de ocorrência da

dengue em 5 km x 5 km de resolução espacial do mapa previsto (área sob a curva operador/ receptor de 0,81 (60,02 sd, n5336) a partir de 336 modelos de árvore de regressão potenciados). As áreas com alta probabilidade de ocorrência de dengue são mostradas em vermelho e áreas com baixa probabilidade em verde. c) Cartonagem do número anual de infecções para todas as idades como proporção da área geográfica nacional ou subnacional (China). Adaptado de BHATT *et al.*, (2013).

1.1.2. Etiologia da Dengue

A doença e suas manifestações são causadas pelo *Dengue virus* (DENV), membro da família de vírus envelopados *Flaviviridae* com seus quatro sorotipos antigenicamente distintos nomeados em ordem numérica de 1 a 4, de acordo com a ordem de sua descrição (GUZMAN *et al.*, 2010; ICTV, 2012; ST JOHN *et al.*, 2013). O vírus da dengue possui um genoma constituído de uma única fita de RNA de sentido positivo ((+) ssRNA) de cerca de onze mil bases. A tradução do genoma dá origem a uma poliproteína grande cujo processamento co-traducional por enzimas virais e do hospedeiro origina três proteínas estruturais (proteínas C, M e E) e sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), envolvidas na replicação viral, na montagem da partícula viral e na modulação da resposta da célula hospedeira (LINDENBACH *et al.*, 2007; GUZMAN *et al.*, 2010; MURPHY & WHITEHEAD, 2011). Os humanos são os principais hospedeiros conhecidos do vírus da dengue, sendo que a transmissão se dá pela picada de fêmeas do mosquito do gênero *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti* e *A. albopictus* (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005; WHITEHEAD *et al.*, 2007; MURPHY & WHITEHEAD, 2011). *A. aegypti* está intimamente associada com as habitações humanas e suas larvas são geralmente encontradas em recipientes artificiais de água, facilitando assim a propagação do vírus. A ILUSTRAÇÃO 2 apresenta a partícula viral e a ILUSTRAÇÃO 3 apresenta o genoma do vírus da dengue.

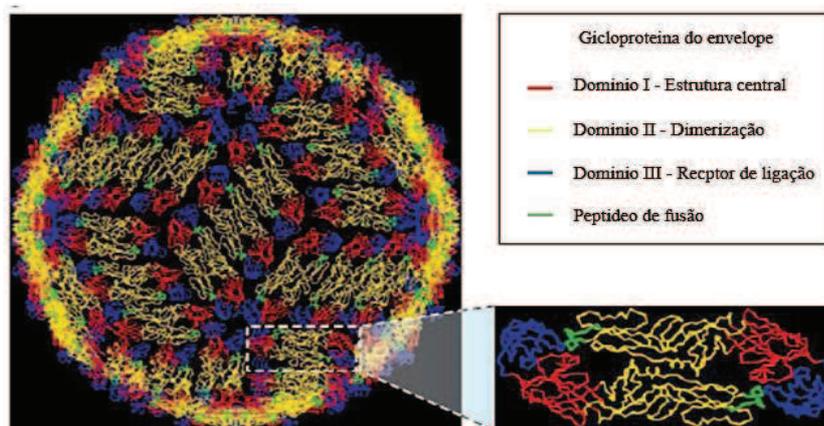


ILUSTRAÇÃO 2: A partícula viral. O vírion dos DENV é geodésico e envelopado com um diâmetro de aproximadamente 50 nm. Ele contém três proteínas estruturais (C – capsídeo, M – membrana e E – envelope e o genoma de RNA. A glicoproteína E é composta por três domínios: Domínio I – estrutura central, o domínio II que apresenta o peptídeo de fusão e o domínio III que contém o receptor de ligação. A proteína de capsídeo, assim como as do envelope se arranjam na conformação 2/3/5, simetricamente isosaédrico, o que influencia, entre outros fatores na velocidade de montagem da partícula viral (capsômeros auto-montáveis) e na geração de anticorpos pelo hospedeiro. Adaptado de WHITEHEAD *et al.*, (2007).

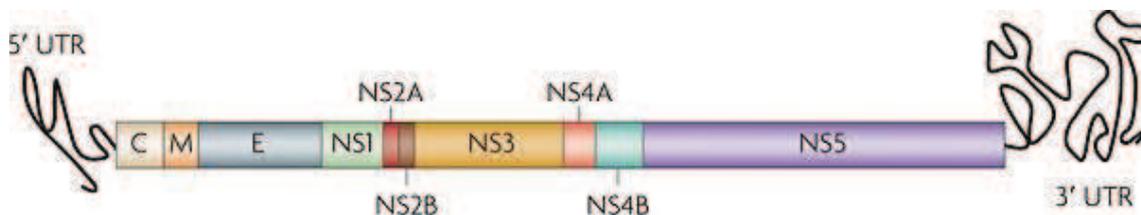


ILUSTRAÇÃO 3: Genoma do vírus da dengue. A janela aberta de leitura codifica três proteínas estruturais: O capsídeo (C), proteína de membrana (M) e envelope (E) (glicoproteína) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). (Adaptado de GUZMAN, *et al.*, 2010).

1.1.3. Transmissão e manutenção do vírus da Dengue

Os DENV são transmitidos aos humanos através da picada do mosquito vetor infectado. O *Aedes aegypti*, um mosquito altamente domesticado, é de longe o vetor predominante dos DENV, contudo as demais espécies (*Aedes albopictus* e o *Aedes*

polynesienses) também são capazes de sustentar essa transmissão. Os DENV podem ser transmitidos verticalmente da fêmea infectada para a sua prole, contudo, muitos mosquitos tornam-se infectados quando estes ingerem sangue virêmico de um indivíduo que se encontra no estado agudo da infecção. Os DENV são um dos únicos arbovírus que não necessitam de um ciclo selvagem para a manutenção da transmissão epidêmica em humanos. Particularmente, a manutenção do vírus é mantida por um ciclo de transmissão humano-mosquito-humano. Um ciclo de transmissão selvagem pode existir nas florestas equatoriais da Ásia, Américas e no oeste da África, entre roedores, artiodátilos, marsupiais, xenartos ou primatas não-humanos e os mosquitos *Aedes*. Contudo, o conhecimento sobre a contribuição deste ciclo para a transmissão epidêmica urbana é pouco explorado (THOISY *et al.*, 2004 ; MONATH, 1994; WHITEHEAD *et al.*, 2007). Em detalhes, o ciclo de transmissão do DENV tem início a partir da picada da fêmea do mosquito em um hospedeiro contaminado onde o vírus presente na circulação é ingerido pelo artrópode (WHITEHEAD *et al.*, 2007). Uma vez dentro do mosquito, o vírus se multiplica no intestino médio e, após algum tempo, são encontrados vírions também no ovário, sistema nervoso e nas glândulas salivares, local este por onde o vírus é passível de transmissão. Este período de incubação tem duração de 10-14 dias. Uma vez presente na circulação sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado, o vírus passa a se multiplicar em células permissivas de órgãos específicos como o baço, fígado e tecidos linfáticos (WHITEHEAD *et al.*, 2007). A ILUSTRAÇÃO 4 apresenta o ciclo de transmissão do vírus da dengue.

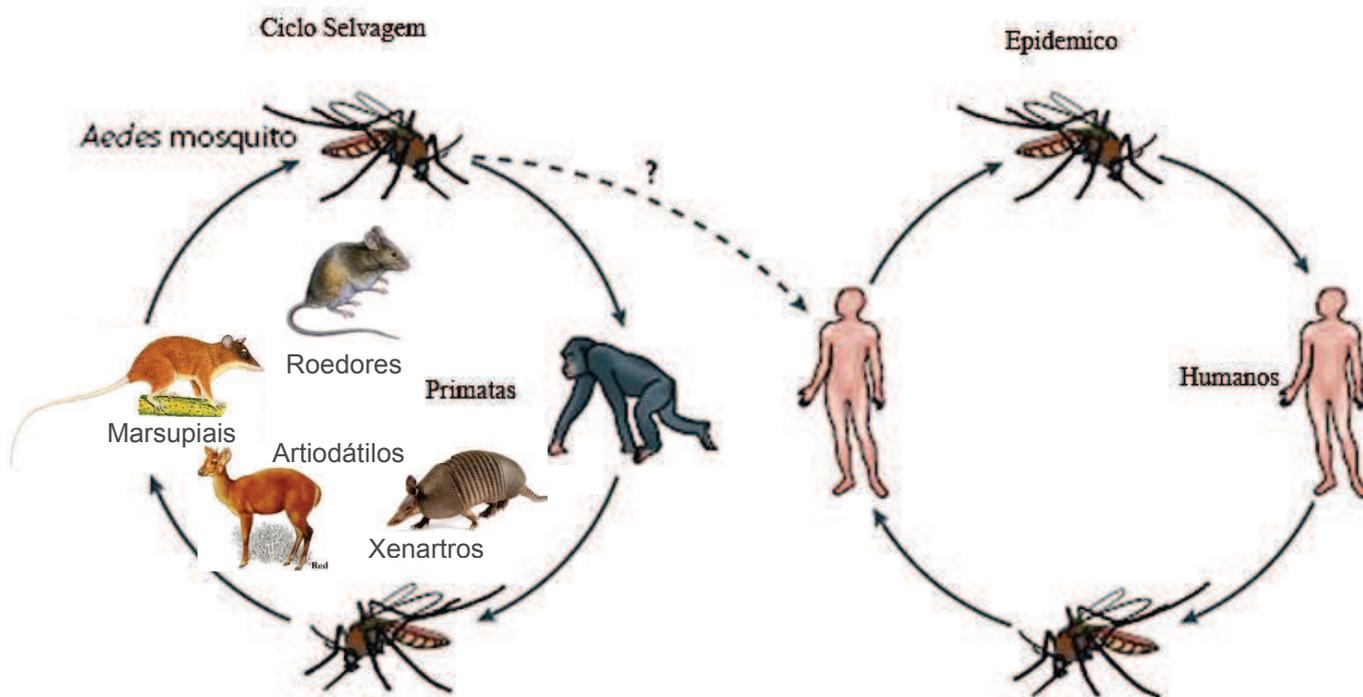


ILUSTRAÇÃO 4: Ciclo de transmissão e manutenção do vírus da dengue. Devido a alta viremia resultante da infecção pelo vírus da dengue em humanos, os vírus são eficientemente transmitidos entre mosquitos e humanos sem a necessidade de um hospedeiro selvagem para a amplificação. O vírus é disseminado dada principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*, que se reproduz em ambientes domésticos e peri – domésticos com reservatórios de água, aumentando a frequência de contato entre os mosquitos e humanos. Um ciclo selvagem também é descrito para o vírus no oeste africano, sudoeste asiático e na região amazônica. (Adaptado de THOISY *et al.*, 2004 e WHITEHEAD *et al.*, 2007).

1.1.4. Ciclo de multiplicação do vírus da Dengue

A multiplicação viral no local da picada parece ocorrer primeiramente nas células dendríticas epiteliais (LOZACH *et al.*, 2005). A habilidade dessas células em responder à sensibilização induzida pelo vírus influencia o perfil da resposta adaptativa, o que, finalmente tem um impacto na qualidade, intensidade e duração da resposta imune (PULENDRAN & AHMED, 2006). Ao longo do curso da infecção o vírus se

replica preferencialmente nas células da linhagem fagocítica mononuclear (macrófagos, monócitos e células dendríticas) (CLYDE *et al.*, 2006; ST JOHN *et al.*, 2013). Para essas populações já foram identificados receptores para a adsorção do vírus da dengue como o receptor de manose em macrófagos (MILLER *et al.*, 2008) e o DC-SIGN (Dendritic cell- specific intracellular adhesion molecule 3(ICAM-3)-grabbing nonintegrin) nas células dendríticas (TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003). No entanto, existem evidências de que mastócitos, células endoteliais, leucócitos e células do fígado, baço, linfonodo, medula óssea, timo, coração, rim, estômago, pulmão e cérebro também podem ser infectadas (SCOTT *et al.*, 1980; HAYES & GUBLER, 1992; KING *et al.*, 1999; NEVES-SOUZA *et al.*, 2005; CLYDE *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2013).

A ILUSTRAÇÃO 5 descreve detalhadamente o ciclo de multiplicação do vírus da dengue em uma célula de mamífero. O ciclo de replicação do DENV inicia-se com a ligação do vírion e sua entrada na célula hospedeira pelo processo de endocitose mediada por receptor. Vários receptores celulares distintos são candidatos a mediadores da adsorção viral, entre eles sulfato de heparana (CHEN *et al.*, 1997; GERMI *et al.*, 2002), *heat shock protein* (Hsp)-70 e Hsp-90 (VALLE *et al.*, 2005), GRP78/BiP (Jindadamrongwech *et al.*, 2004), CD14 (CHEN *et al.*, 1999), bem como DC-SIGN (NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2003; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003; LOZACH *et al.*, 2005), L-SIGN (liver/lymph node- specific ICAM-3-grabbing nonintegrin) (TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003) e o receptor de manose (MR, mannose receptor) (MILLER, *et al.*, 2008). Existem evidências consideráveis sugerindo que o primeiro passo numa infecção primária pelo DENV seria a ligação da glicoproteína viral E a qual está presente na superfície de partículas virais maduras como homodímeros à receptores na superfície de células permissivas (ILUSTRAÇÃO 5, passo 1). A proteína E consiste de três domínios. O domínio I está presente na região N-terminal e garante organização

estrutural. O domínio II, ou domínio central está envolvido na dimerização e contém uma alça hidrofóbica essencial à fusão da proteína E na membrana celular. O domínio III situado na região C-terminal é tido como o domínio de reconhecimento pelo receptor e possui uma dobra semelhante à imunoglobulina ou “immunoglobulin-like fold” (CHIN et al., 2007; HUERTA-ZEPEDA et al., 2008). A interação da proteína E com o(s) receptor(es) leva a uma série de eventos tanto na partícula viral quanto na membrana e no citoesqueleto da célula alvo, permitindo assim a entrada do vírus.

Dois tipos de receptores parecem estar envolvidos em facilitar a entrada do DENV na célula do hospedeiro, dependendo do tipo da célula alvo (HUERTA-ZEPEDA et al., 2008). O primeiro tipo aparenta ser receptores de baixa afinidade e especificidade, incluindo moléculas de adesão do tipo aminoglicanas, tais como o sulfato de heparana, que são expressos numa ampla variedade de tipos celulares (GERMI et al., 2002; LIN et al., 2002). O segundo tipo corresponde a receptores semelhantes a lectina (lectin-like) tais como o DC-SIGN e o MR, expressos em algumas células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas imaturas, monócitos e macrófagos (LOZACH et al., 2005; TASSANEETRITHEP et al., 2003; MILLER et al., 2008). Presumivelmente, estas moléculas concentram as partículas virais na superfície celular e facilitam o reconhecimento pelos receptores do segundo tipo, tais como as proteínas do choque térmico (do inglês, *heat shock proteins*) HSP 70 e HSP 90. Esta interação induz a formação de endossomas. Este fenômeno é designado como “endocitose mediada por receptor” e pode ser visto na ILUSTRAÇÃO 5, passo 2, que permite a entrada do vírus na célula hospedeira (LOZACH et al., 2005; TASSANEETRITHEP et al., 2003; REYS-DEL VALLE et al., 2005; HUERTA-ZEPEDA et al., 2008). No entanto, o papel das HSP 70 e 90 como receptores para o DENV ainda é uma questão em debate e pode depender de qual tipo celular está sendo

examinado (CABRERA-HERNANDEZ et al., 2007; CHAVEZ-SALINAS et al., 2008; REYES-DEL VALLE et al., 2005). As duas HSP estão associadas com microdomínios de membrana, cuja interação é importante para entrada do DENV. HSP 70/90 também parecem estar associadas com a entrada de outros flavivirus (LIN et al., 2007; REN et al., 2007) e do vírus da hepatite E (ZHENG et al., 2010).

Algumas proteínas conhecidas como proteínas adaptadoras, tal como a GRP78 são tidas como parte do complexo de entrada do DENV mas suas funções permanecem elusivas (CABRERA-HERNANDEZ et al., 2007). Associações entre a proteína E e proteínas adaptadoras podem ser designadas como “complexos de fusão”. A presença de *lipid rafts* ou poços cobertos na formação de complexos de fusão viral indicam que a formação de vesículas depende de colesterol (em células humanas) ou Clatrina (em células de mosquitos) (ACOSTA et al., 2008; LEE et al 2008; VAN DER SCHAAR et al., 2008). Juntos, estes resultados mostram que independentemente do receptor utilizado, pelo menos dois mecanismos de entrada de flavivirus em células de artrópodes ou de mamíferos existem: a entrada viral pode ocorrer por fusão direta do vírus com a membrana celular ou por endocitose mediada por clatrina (HASE et al., 1989a; HASE et al., 1989b; LIM E NG, 1999; SE-THOE et al., 2000; CHUENG, 2004; CHU et al., 2006; KRISHNAN et al., 2007; SUKSANPAISAN et al., 2009)

Outra forma de entrada do vírus na célula seria pelo fenômeno conhecido como ADE (do inglês Antibody-Dependant Enhancement ou intensificação mediada por anticorpo), onde a ligação de anticorpos sub-neutralizantes à partícula viral facilitariam a entrada do vírus através da ligação com receptores da porção Fc (FcγR). Esse fenômeno será discutido mais adiante devido a sua associação com as formas grave da infecção.

Após a internalização do vírus (ILUSTRAÇÃO 5, passo 2) o endossoma primário começa gradualmente a sofrer um processo de acidificação. Quando atingido um pH entre 6.2-6.4 a dissociação dos homodímeros da proteína E é facilitada permitindo que a alça de fusão presente em cada monômero se ancore à membrana endossomal, catalizando assim a formação de homotrímeros da proteína E (HEINZ et al., 2004). Esta associação trimérica induz uma dobra na membrana endossomal, promovendo assim a formação de uma ponte (também chamada de pedúnculo de hemifusão) entre o envelope viral e a membrana do endossomo, ocorrendo assim a fusão (ILUSTRAÇÃO 5, passo 3). Com este evento, o nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma (ILUSTRAÇÃO 5 passo 4). Os mecanismos da liberação do nucleocapsídeo permanecem pouco esclarecidos. Após o desnudamento (ILUSTRAÇÃO 5, passos 3 e 4), o genoma viral é preparado para a tradução pelo maquinário da células hospedeira.

Uma vez liberado de suas proteínas estruturais, o genoma do DENV se torna acessível para realizar suas três funções principais: a primeira, servir como RNAm para a síntese da poliproteína viral (tradução), a segunda, como molde para a síntese de mais fitas de RNA (primeiros moldes negativos que serviram para formar RNA genômicos de sentido positivo) e terceiro, como genoma para ser incorporado à novas partículas virais. É importante ressaltar que a tradução do genoma do DENV é um processo acoplado à replicação, uma vez que o genoma viral precisa ser traduzido para síntese das proteínas não-estruturais que são fundamentais para a replicação do RNA (HARRIS et al., 2006)

A tradução do genoma RNA(+) do DENV produz uma única poliproteína ancorada ao retículo endoplasmático (ILUSTRAÇÃO 5, passo 5). A síntese da poliproteína viral é iniciada no códon AUG proximal da região 5' no RNA. A estrutura

de cap 5' que o RNA viral apresenta facilita a montagem e o recrutamento dos fatores eucarióticos de iniciação (eIFs, tais como eIFE e eIF4G) e dos ribossomos. Curiosamente, a proteína ligante a poli(A) (PABP) pode ligar-se a região 3' não-traduzida (3' UTR), apesar do genoma viral não apresentar uma cauda poliadenilada, sugerindo que uma circularização do genoma através da interação eIFG4-PABP pode ser necessária para um processo eficiente de tradução (POLACEK et al., 2009).

O processo de síntese do RNA(-) (ILUSTRAÇÃO 5, passo 6) não é bem compreendido. Alguns resultados propõem que a replicação (ocorrendo in tandem à tradução) ocorreria em estruturas membranosas intracelulares cuja origem não é bem definida (CLYDE et al., 2006; MILLER E KRIJNSE-LOCKER, 2008). Porém, sabe-se que seguidamente à tradução, proteínas não-estruturais do vírus junto com fatores do hospedeiro formam o complexo de replicação responsável pela síntese do RNA(-) complementar ao RNA(+), resultando em um RNA dupla-fita intermediário. O ciclo completo de replicação do RNA do DENV inclui a síntese do RNA(-) e dos novos RNA(+) que funcionarão como RNAm e como RNA genômico para a nova progênie viral.

Após a síntese da poliproteína e replicação do genoma, o próximo passo para a formação de novas partículas virais é a encapsidação. Apesar das primeiras indicações de interação entre o RNA viral e a proteína estrutural C terem sido demonstradas a mais de uma década (KHROMYKH et al., 1999), os mecanismos de formação do complexo RNA-proteína C (e conseqüente formação do nucleocapsídeo) permanecem obscuros. Existem fortes evidências (MA et al., 2004; SAMSA et al., 2009; HEATON E RANDALL, 2010) apontando para uma importante participação de gotículas lipídicas (LD, do inglês, *lipid droplets*) e para estruturas membranosas derivadas do retículo endoplasmático. Assim, as partículas virais parcialmente montadas emergem como

brotamentos do lúmen do retículo endoplasmático (ILUSTRAÇÃO 5, passo 7) e são envelopadas por membranas lipídicas contendo as outras duas proteínas estruturais prM e E na forma de heterodímeros prM-E, que são incorporados aos vírions imaturos por interação com o nucleocapsídeo (MUKHOPADHYAY et al., 2005).

Durante este processo de egresso da nova progênie viral através das vias secretórias da célula hospedeira, a proteína E presente nos vírions imaturos sofre uma série de mudanças conformacionais reversíveis e dependentes de pH (ILUSTRAÇÃO 5, passo 8). No estágio imaturo, os heterodímeros prM-E são agrupados como trímeros. Em partículas maduras a proteína E se apresenta com homodímeros e, como mencionado anteriormente, formam homotrímeros quando o vírus se funde à membrana endossomal, na sua entrada. Durante este processo de transporte, as partículas virais atravessam a rede trans-Golgi onde a proteína prM é clivada pela protease celular furina, processo essencial para a maturação do DENV (ILUSTRAÇÃO 5, passo 9). Porém, o segmento pr continua associado ao vírion até que este seja liberado da célula. A retenção do segmento pr previne a ligação prematura da proteína E à membrana exossomal durante o trânsito da partícula pelo ambiente ácido da rede trans-Golgi. Finalmente, as partículas virais maduras e as proteínas pr clivadas são transportadas e liberadas no meio extracelular por exocitose (ILUSTRAÇÃO 5, passos 10 e 11) (BRESSANELLI et al., 2004; PERERA E KUHN, 2008; ZYBERT et al., 2008; YU et al., 2009)

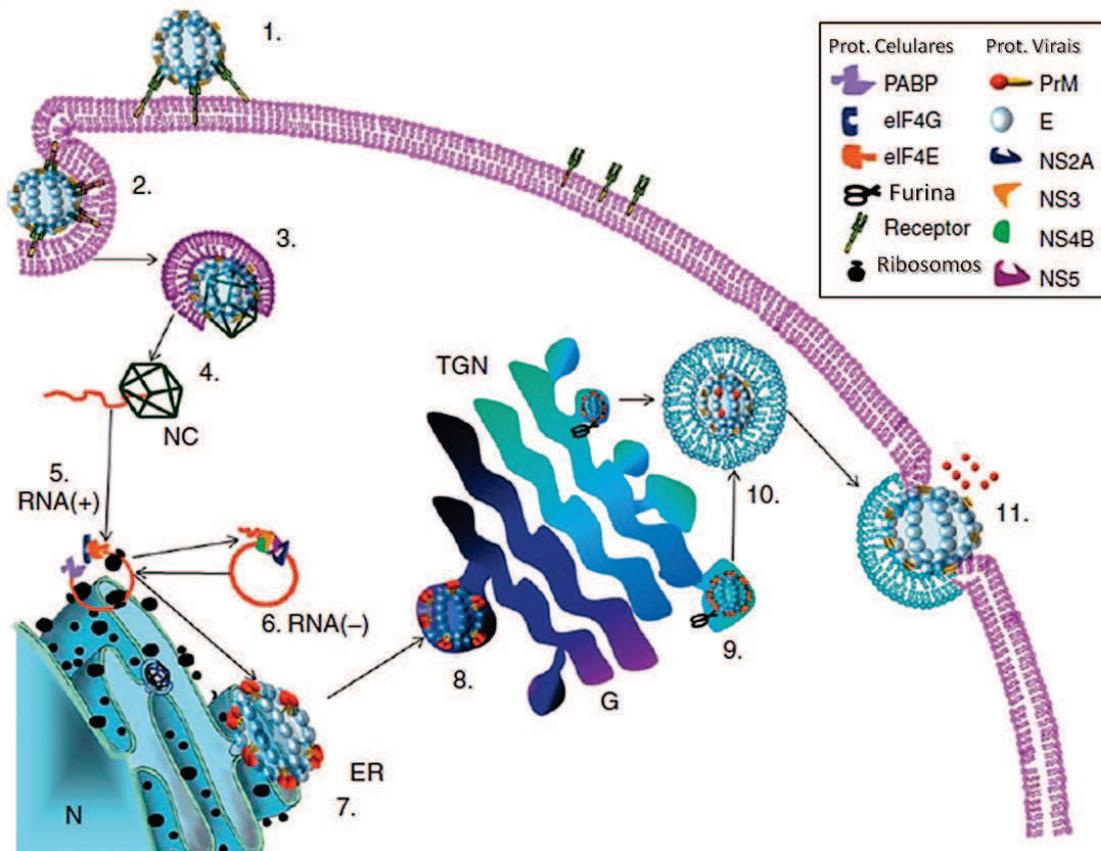


ILUSTRAÇÃO 5: Representação esquemática do ciclo de vida do vírus da dengue.

A proteína E é o principal componente da superfície viral. *Passo 1 – Ligação:* O passo inicial do ciclo viral é a ligação da proteína E a um receptor da superfície celular (formando um complexo de fusão) tal como o sulfato de heparana, lectinas tipo-C manose-específicas entre outros citados no texto, porém um receptor específico para a internalização do vírus nas células hospedeiras ainda não foi identificado. *Passo 2 – Endocitose:* Após ligação ao receptor, o vírus é internalizado nas células através do processo de endocitose mediado por clatrina e as partículas virais são transportadas para endossomos. *Passo 3 - Fusão das membranas:* No citoplasma, acidificação da luz do endossomo induz mudanças estruturais na proteína E e promove a fusão entre a partícula viral e a membrana do endossomo. *Passo 4 – Desnudamento:* Um poro de fusão é formado e o nucleocapsídeo (NC) é levado ao citoplasma e o RNA viral (em laranja) é liberado do NC no citoplasma. *Passo 5 – Tradução:* O RNA viral de sentido positivo (RNA(+)) é diretamente traduzido numa única poliproteína ancorada ao retículo endoplasmático (ER). A estrutura do cap 5' do RNAm viral promove a montagem de fatores eucarióticos de iniciação (eIFs) tais como eIF4E e eIF4G causando o recrutamento de ribossomos para o RNAm viral. Ainda, mesmo na ausência de uma cauda poliadenilada, a proteína ligante à poli(A) (PABP) interage com a região 3' não

traduzida (3' UTR), sugerindo que o genoma viral é circularizado através de interação PABP-eIF4G. A poliproteína é então processada por proteases virais e celulares em três (e posteriormente 4) proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais (NS, algumas em destaque). *Passo 6 – Replicação:* As proteínas NS (em destaque na ilustração) ativamente replicam o RNA(+) viral em complexos de replicação associados às membranas celulares, produzindo assim cópias de sentido negativo, RNA(-), que por sua vez são utilizadas como moldes para produção de mais RNA(+), que dessa vez servirá como RNA genômico de novas partículas. *Passo 7 – Montagem:* Após a tradução e replicação do RNA, a montagem do vírus começa quando uma cópia do RNA interage com diversas cópias da proteína C, formando nucleocapsídios que são por sua vez envelopados pelo heterodímero PrM-E, que formaram partículas imaturas que vão então brotar no lúmen do retículo endoplasmático rugoso. *Passos 8 e 9 – Maturação:* Partículas virais transitam através do aparelho de Golgi (G) e da rede *trans*-Golgi (TGN) onde a PrM é clivada pela proteína celular furina, resultando em partículas contendo as proteínas Pr, M e E. *Passo 10 e 11 – Exocitose e liberação:* A partícula madura do vírus migra para a membrana celular e é liberada da célula, juntamente com a proteína Pr resultante da maturação. (Adaptado de URCUQUI-INCHIMA *et al.*, 2010).

1.1.5. Diagnóstico da infecção

O diagnóstico da infecção pode ser feito através da detecção do vírus (isolamento viral, técnicas moleculares), captura de antígenos dengue específicos NS1 e anticorpos IgG e IgM através de testes sorológicos (Enzimaimunoensaio/ ELISA), teste de neutralização com redução de placas, etc (GUZMÁN; KOURI, 2004).

O método mais adequado a ser selecionado e utilizado para o diagnóstico da dengue depende da fase e do tipo da infecção. Um eficiente diagnóstico é obtido quando levados em consideração dois aspectos: momento de coleta da amostra e para qual tipo de exame essa amostra se destinará (CORDEIRO, 2008). Segundo HALSTEAD, (2007), o diagnóstico da dengue teria duas fases, a saber: fase I) período de febre e viremia com detecção de antígenos NS1 no sangue e a fase II) período logo após a febre seguido de algumas semanas onde anticorpos IgM e IgG sorotipo específicos estão elevados.

No período de febre, o diagnóstico é feito baseado nos sinais e sintomas clínicos e através da detecção molecular de partículas virais, isolamento viral e proteínas virais (NS1). A ILUSTRAÇÃO 6 demonstra esquematicamente as fases de viremia e febre e os testes diagnósticos mais adequados para cada fase da infecção.

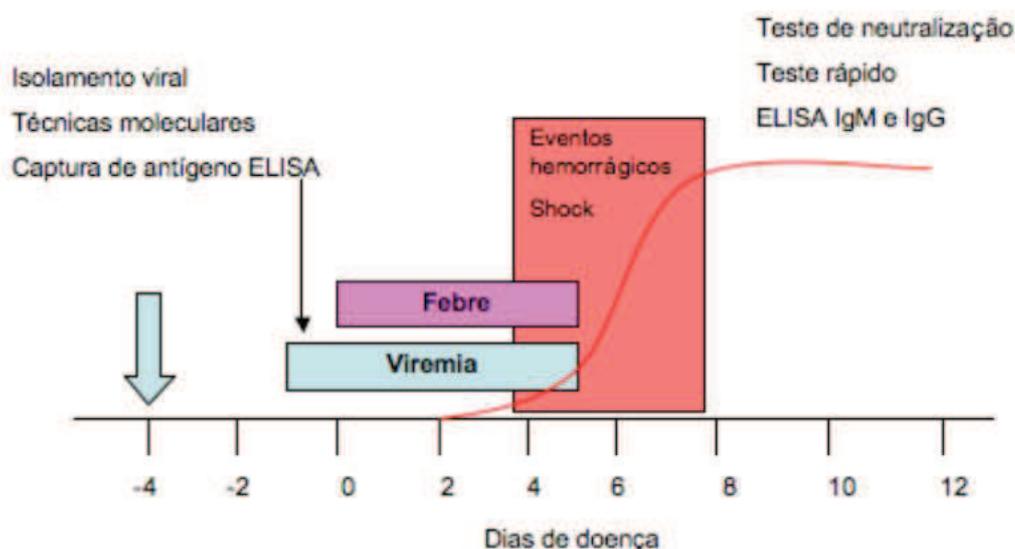


ILUSTRAÇÃO 6. Curso da infecção da dengue e tempo de diagnóstico. Modificado de HALSTEAD (2007).

O período de viremia depende do tipo de infecção; nas infecções primárias a circulação de vírus no sangue dura aproximadamente dois a sete dias. Nas infecções secundárias esse período de viremia seria de dois a três dias (SILVA, 2008). O RNA do vírus da dengue pode ser detectado no período de viremia através de técnica molecular de reação em cadeia de polimerase usando a transcriptase reversa (RT-PCR) (GOMES et al., 2007; MELO; ROMANO; ZANOTTO, 2009; SILVA, 2008) e algumas modalidades como “*single-tube nested*” PCR (STNPCR) (GOMES et al., 2007), multiplex PCR (HARRIS et al., 1998; LAI et al., 2007) e *real-time* PCR (CHAO; DAVIS; CHANG, 2007; CHEIN et al., 2006; FIGUEREDO et al., 2008; GUZMÁN; KOURI, 2004; GURUKUMAR et al., 2009; JOHNSON; RUSSEL; LANCIOTTI, 2005;

KONG et al., 2006). A captura de NS1 sorotipo específico no sangue é feita através de teste rápido por imunocromatografia e por ELISA, utilizando anticorpo monoclonal. Essa técnica tem sido utilizada em muitos países do mundo como uma opção de teste de “baixo custo”, sensível e específico durante o período de febre. Um estudo com pacientes infectados com DENV1 mostrou que a cinética do aparecimento de NS1 no sangue tem pico nos dias 6 a 10 depois do início da febre (HALSTEAD, 2007).

1.1.6. Formas de manifestação da doença

O período de incubação médio após a picada do mosquito é de 4 a 7 dias. Dependendo da cepa do vírus e de fatores relacionados ao paciente, tais como idade e estado do sistema imunológico, esse período pode ser assintomático. Em seguida com a viremia, podem surgir, subitamente, febre e sintomas constitucionais como dor generalizada ou suores noturnos que permanecem por 5 a 6 dias. Após a fase febril ou virêmica, o paciente pode se recuperar ou evoluir para uma fase com aumento de permeabilidade vascular levando a quadros mais graves (PEELING *et al.*, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a infecção pelo vírus da dengue define-se clinicamente de duas formas: a forma clássica ou febre da dengue (FD) e a febre hemorrágica da dengue (FHD/DSS). Dentro das duas formas de manifestação, existem variações de gravidade. A forma clássica pode se apresentar como uma doença febril indiferenciada, a qual não pode ser distinguida de outras infecções virais, por isso também é chamada de síndrome viral. A febre da dengue, outro quadro da forma clássica, caracteriza-se por febre alta, cefaléia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, náuseas e vômitos, diarreia, hipotensão postural, dor abdominal, lombar e de membros inferiores. Mesmo sendo a forma clássica, pode haver manifestações hemorrágicas

como petéquias, epistaxe, gengivorragia e hemorragia digestiva. A febre pode ser bifásica e tende a durar 2 a 7 dias (NARAYANAN *et al.*, 2002). A forma hemorrágica, forma grave da dengue, inicialmente possui as mesmas manifestações da forma clássica. Os fenômenos hemorrágicos ocorrem no segundo ou terceiro dia da doença e manifestam-se principalmente na pele, podendo surgir metrorragias, epistaxes, gengivorragia, hematêmese e melena. A febre dura de 2 a 7 dias, seguida por uma queda abrupta na temperatura corpórea. A evolução do quadro pode cursar com recuperação ou progresso para uma fase caracterizada por permeabilidade plasmática aumentada e sinalizada por taquicardia e hipotensão. Quando a alteração do controle do fluxo plasmático através da parede vascular é grave, outros sinais de distúrbio circulatório surgem, tais como: prolongamento do tempo de enchimento capilar, pulso fino e rápido, palidez, extremidades frias e diminuição do fluxo urinário, que sinalizam o estado de pré-choque. Derrames pleural, peritoneal e pericárdico, também podem ocorrer. O quadro de dengue hemorrágico associado a grande risco de morte é a síndrome do choque de dengue. Dor abdominal aguda, vômito persistente e hipotensão brusca são sinais de alerta de choque. O choque prolongado, comumente é acompanhado de acidose metabólica, coagulação intravascular disseminada que pode culminar em hemorragia maciça (MALAVIGE *et al.*, 2004). A resposta adequada à terapia de reposição de fluidos leva à recuperação em 2 a 5 dias. Por outro lado, na maioria dos casos, o choque pode levar a complicações como falência hepática, renal, encefalopatia, miocardite e, finalmente, óbito (SINGHI *et al.*, 2007). Os achados laboratoriais mais comuns na febre hemorrágica da dengue são: baixa contagem de plaquetas ($<100 \times 10^9/L$), leucopenia no início da doença, leucocitose atípica, perfil de coagulação anormal (tempo de tromboplastina parcial prolongado, produtos de

degradação do fibrinogênio) e diminuição dos níveis de complemento sérico (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 2001).

1.1.7. Fisiopatologia da dengue hemorrágica

A base fisiopatológica da dengue hemorrágica ainda não é totalmente elucidada. 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 estado nutricional do hospedeiro (ROTHMAN, 2003). Por fim, vários estudos têm associado a resposta imune do hospedeiro ao vírus e ao desenvolvimento da forma hemorrágica da doença. (ROSEN, 1977; HALSTEAD, 1989; ROTHMAN, 2003; FAGUNDES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013). 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 complemento e seus produtos, liberação exacerbada de mediadores solúveis, como citocinas, entre outros (BOKISCH *et al.*, 1973; THEOFILOPOULOS *et al.*, 1976; HALSTEAD, 1979; MALASIT, 1987; HALSTEAD, 1989; MARKOFF *et al.*, 1991; CHUNGUE *et al.*, 1994; KURANE *et al.*, 1994; MORENS, 1994; FALCONAR, 1997; CHATURVEDI *et al.*, 2000; LIBRATY *et al.*, 2002; MANGADA *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2005).

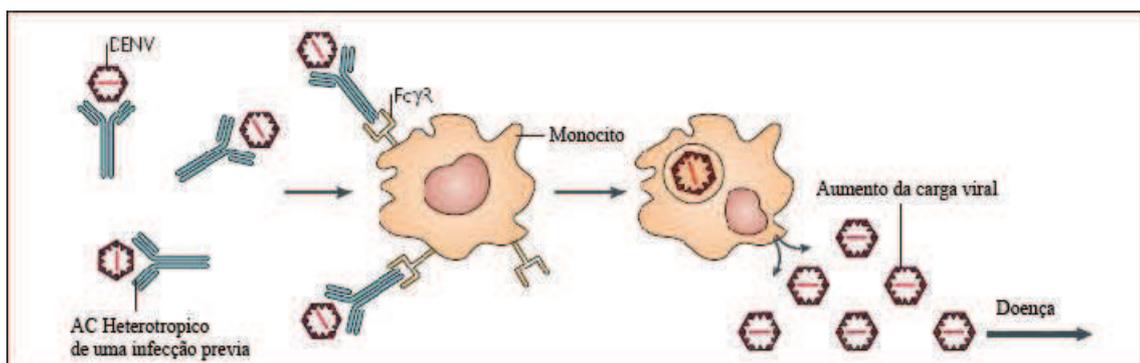
1.1.8. Teoria baseada na resposta imune do hospedeiro: “Intensificação dependente de anticorpos” (ADE) e outros eventos mediados por anticorpos.

A primeira infecção por Dengue que um indivíduo adquire é caracterizada pela produção de anticorpos contra as proteínas de superfície E e NS1.(GUBLER *et al.*, 1998; VAUGHN *et al.*, 2000; ROTHMAN, 2004; NAVARRO-SÁNCHEZ *et al.*, 2005; STEPHENSON, 2005; PANG *et al.*, 2007; KYLE & HARRIS, 2008; YAUCH & SHRESTA, 2008; SCHMIDT, 2010; DEJNIRATTISAI *et al.*, 2010; ROTHMAN, 2011; GUZMAN *et al.*, 2013). A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue confere imunidade duradoura para o sorotipo em questão (GREEN & ROTHMAN, 2006; GUZMAN & VASQUEZ, 2010). A proteção cruzada entre os diferentes heterólogos pode ser encontrada logo após uma infecção primária, entretanto é transitória, uma vez que o fenômeno de neutralização do DENV é considerado “*multi-hit*”, ou seja, necessita da ligação de múltiplos anticorpos para que haja a neutralização de um único vírion (CLYDE *et al.*, 2006; GREEN & ROTHMAN, 2006; GUZMAN & VASQUEZ, 2010; ROTHMAN, 2011). Assim, essa proteção geralmente desaparece em cerca de seis meses após a infecção primária em adultos e também nesse mesmo período em crianças após a interrupção da lactação em mães imunes, resultando em declínio natural do número desses anticorpos com proteção passiva, onde o hospedeiro passa então a ser susceptível aos três sorotipos restantes (GREEN & ROTHMAN, 2006; GUZMAN & VASQUEZ, 2010; ROTHMAN, 2011).

Estudos realizados na Tailândia demonstraram que em mais de 99% dos casos de FHD os indivíduos apresentaram anticorpos heterólogos contra o sorotipo que causou a FHD (KURANE, 2007). Em outro estudo, que relatou a 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 (GUZMÁN *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-SÁNCHEZ *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, e estudos ainda mais recentes em humanos demonstram correlação positiva entre o pico da viremia e a gravidade da doença, sustentando 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 a ocorrência de FHD durante a infecção primária pelos DENV em crianças durante o primeiro ano de vida nascidas de mães imunes aos DENV, as quais 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.

Resumidamente, essa teoria 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 γ R (Fc γ R) de imunoglobulinas presentes na membrana celular dos leucócitos, especialmente dos monócitos e macrófagos. Esses anticorpos são denominados anticorpos sub-neutralizantes e o processo conhecido como intensificação dependente de anticorpos (ADE). Uma vez que o anticorpo é heterólogo e o vírus não é neutralizado, este permanece livre para se replicar dentro da maquinaria de 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, o qual também tem sido correlacionado com a maior incidência dos casos de DHF/SCD. (GLUBER, 1998; VAUGHN *et al.*, 2000; ROTHMAN, 2004; NAVARRO-SÁNCHEZ *et al.*, 2005; STEPHENSON, 2005; PANG *et al.*, 2007; KYLE & HARRIS, 2008; YAUNCH & SHRESTA, 2008). A ILUSTRACÃO 7 apresenta o fenômeno de ADE:



ILUSTRACÃO 7: Modelo de intensificação dependente de anticorpos na replicação do vírus da dengue. A replicação do vírus através da intensificação dependente de anticorpos ocorre quando um anticorpo não-neutralizante heterólogo presente no hospedeiro proveniente de uma infecção primária pelo DENV se liga a uma partícula de DENV infectante durante uma infecção subsequente por sorotipo

heterólogo, mas não é capaz de neutralizar o vírus. Assim, o complexo anticorpo-vírus liga-se aos receptores FC γ (FC γ R) nos monócitos circulantes, todavia facilitando a infecção dos tipos celulares que expressam FC γ R no corpo, nas quais não seriam infectadas na ausência do anticorpo. Isso resulta no aumento da replicação do vírus, levando a um potencial aumento de desenvolvimento de doença grave. Modificado da versão original publicado por *Nature Microbiology Reviews* (2007).

1.1.9. A Resposta inflamatória e liberação de citocinas e produtos de morte celular durante a dengue

Independentemente do mecanismo associado, a evolução da doença parece ser dependente da instalação de uma resposta imune anômala que causa aumento de permeabilidade vascular endotelial e choque (ROSEN, 1977; HALSTEAD, 1989; ROTHMAN, 2003; FAGUNDES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013). Estudos de infecções agudas por vírus da dengue têm demonstrado aumento dos níveis séricos de vários mediadores solúveis, cujos títulos podem ser diferentes quando comparados aos perfis em indivíduos apresentando graus distintos de gravidade da doença. IL-6, CXCL-8/IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-18 estão associados a quadros mais graves (ATRASHEUSKAYA *et al.* 2003; FAGUNDES *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013; MANEEKAN *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013; FAGUNDES, ÁVILA *et al.*, (*in preparation*)). IFN- γ , IL-2 e IL-12, são citocinas produzidas na resposta imune do tipo 1. Estão presentes em níveis elevados nos primeiros três dias da doença e o perfil Th1 correlaciona-se com proteção contra formas clínicas com maior morbidade (CHATURVEDI *et al.*, 1999; PACSA *et al.*, 2000; HO *et al.*, 2004). Entretanto, IFN- γ e TNF- α podem ter ações que favoreçam a infecção. IFN- γ pode induzir a produção de receptores Fc γ em monócitos e TNF- α pode inibir mecanismos

apoptóticos das células dendríticas (LUDEWIG *et al.*, 1995; KÅREHED *et al.*, 2006). Nesse contexto, a liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias conhecida como a “teoria da tempestade de citocinas” parece ser um importante fator a ser considerado durante o desenvolvimento da FHD/SSCD (BOKISCH *et al.*, 1973; HALSTEAD, 1979; MALASIT, 1987; HALSTEAD, 1989; CHATUVERDI *et al.*, 2000; MANGADA *et al.*, 2004).

Já na febre hemorrágica da dengue e na síndrome do choque da dengue, um achado importante é a diminuição do número dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ e células *Natural killer* (NK). A quantidade de linfócitos B não é alterada (MALAVIGE *et al.*, 2004; RIVINO *et al.*, 2013; YOSHIDA *et al.*, 2013). As quimiocinas também têm sido associadas à patogênese e à gravidade das infecções e têm sido detectadas em estudos *in vitro* e *in vivo* (GUABIRABA *et al.*, 2010; RENNESON *et al.*, 2011). CCL2/MCP-1, proteína que compromete as junções oclusivas das células do endotélio vascular, é detectada durante a forma hemorrágica e o choque da dengue (LEE *et al.*, 2006; GUABIRABA *et al.*, 2010). Outro marcador apontado como um potencial indicador de mal prognóstico da infecção é PTX-3, uma proteína estruturalmente relacionada à proteína C reativa, cujos níveis são elevados em pacientes com a síndrome do choque da dengue. (MAIRUHU *et al.*, 2005)

Interessantemente, outras condições como a sepse polimicrobiana e a infecção por Influenza também são caracterizadas por uma resposta inflamatória exacerbada ou alterada e os danos aos tecidos do hospedeiro foram diretamente associados à maior produção de mediadores inflamatórios (ALVES-FILHO *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2010, MEDINA & GARCIA-SASTRE, 2011). Isso sustenta a ideia de que mecanismos similares possam ocorrer no contexto da infecção por dengue grave e contribuir diretamente para a imunopatologia da infecção.

A liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias logo após a infecção pelo vírus da dengue induz a migração de leucócitos aos órgãos alvo da infecção (SOUZA *et al.*, 2009; FAGUNDES *et al.*, 2011; RENNESON *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012; GUABIRABA *et al.*, 2013). Em vários modelos experimentais, infecciosos ou estéreis, a migração desenfreada de neutrófilos a órgãos lesionados em períodos específicos pode amplificar o processo inflamatório e induzir a morte celular por apoptose e necrose (JAESCHKE *et al.*, 1996; MOLNAR *et al.*, 1997; McDONALD & KUBES, 2012; MCGIL *et al.*, 2012; MARQUES, *et al.*, 2012). Durante esse processo, mitocôndrias provenientes do meio intracelular de células lesionadas são expulsas do citosol e destruídas e o DNA mitocondrial é liberado no meio extracelular (MARQUES *et al.*, 2012). Níveis elevados de DNA circulante no plasma de pacientes com câncer de ovário (ZACHARIAH *et al.*, 2008), artrite reumatoide (ZHONG *et al.*, 2007) e sepse (RHODES *et al.*, 2006) têm sido relatados como marcadores de gravidade e progressão para formas mais graves dessas doenças. Porém, pouca informação há sobre a presença de DNA livre circulante em doenças infecciosas virais e tampouco o uso desse dado como marcador da progressão da dengue.

HA e colaboradores, (2011), avaliaram os níveis de DNA livre circulante em pacientes internados diagnosticados com quadro grave de dengue hemorrágica FHD/SCD. Neste estudo, a presença desse material no soro correlacionou-se fortemente com a gravidade da doença e a hepatite manifestada nos pacientes. Porém, a morte celular deve ocorrer, mesmo nas formas mais brandas da doença. A elevação de enzimas hepáticas indicadoras de lesão no fígado, Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) no soro é comum na FD, ocorrendo em 65-97% dos pacientes e podendo atingir sua totalidade durante o período convalescente da doença (7-10 dias) (KUO *et al.*, 1992; PARKASH *et al.*, 2010; TRUNG *et al.*, 2010). Além

disso, níveis elevados de AST e ALT têm sido associados a sangramento, decréscimo de plaquetas circulantes (KUO *et al.*, 1992; PARKASH *et al.*, 2010; TRUNG *et al.* 2012) morte celular no fígado e em último caso, com a progressão da FD para a FHD/SCD (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da lesão hepática observada na dengue clássica parece estar associado com a ativação de células *Natural Killer* logo após a infecção pelo vírus (RENNESON *et al.*, 2011; SUNG *et al.*, 2012). Efeito que posteriormente foi relacionado com a rápida indução de IL-22 no fígado, contribuindo para o desenvolvimento da lesão celular durante a dengue (GUABIRABA *et al.*, 2013). Além disso, linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs) também têm sido relacionados ao desenvolvimento de lesão e morte celular no fígado. Porém, essa população de células parece atuar apenas em fases tardias da doença, (SUNG *et al.*, 2012) podendo dessa forma, ser um dos principais responsáveis indiretos pela liberação de DNA mitocondrial livre proveniente de lesão hepática nessas condições.

As mitocôndrias são endossimbiontes evolutivos derivados de bactérias, compartilhando motivos moleculares muito semelhantes no que diz respeito ao seu material genético. (ZHANG *et al.* 2010). Dessa forma, a imunidade inata pode desempenhar um importante papel no processamento desse material, desencadeando ou amplificando a resposta inflamatória ao reconhecer DNA mitocondrial livre na circulação.

1.1.10. O papel da imunidade inata durante a Dengue

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores, sendo o interferon (IFN) tipo I (alfa e beta) a maior arma na defesa antiviral contra todos os tipos de vírus (HALLER; KOCHS; WEBER, 2006; COFFEY

et al., 2009; DIAMOND et al., 2009). Os interferons alfa e beta são produzidos por muitos tipos de células em resposta a infecções virais e induzem um estado antiviral através do aumento da expressão dos genes com função direta e indireta antiviral (DIAMOND et al., 2009). É através do reconhecimento de estruturas microbianas conservadas ou produtos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) por um conjunto de receptores chamados receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs) que se inicia a via de indução dos IFN- α/β (HALLER; KOCHS; WEBER, 2006; SAITO; GALE, 2007; TAKEUCHI; AKIRA, 2007). Três classes de PRRs foram identificadas, *retinoic acidinducible gene I (RIG-I)- like helicases* (RLHs), *NOD-like receptor* e *Toll-like receptors* (TLRs) (TAKEUCHI; AKIRA, 2007).

A família de PRRs melhor caracterizada é a dos TLRs que são expressos em várias células do sistema imune, incluindo macrófagos e células dendríticas (ZHU; HUANG; YANG, 2007). O receptor *toll* foi originalmente descoberto na década de 1990 em insetos do gênero *Drosophila* como componente essencial à proteção das moscas contra infecções fúngicas (LEMAITRE *et al.*, 1996). Em 1997, foi identificado e caracterizado um homólogo da proteína *toll* em humanos sendo denominado receptor “*toll-like*” (MEDZHITOV *et al.*, 1997). Há pelo menos 13 membros da família dos TLRs já caracterizados, onde pelo menos os TLRs 2, 3, 4, 7, 8, e 9 funcionam como PRRs virais (SAITO; GALE, 2007).

TLRs 3, 7, 8 e 9 estão localizados nas vesículas citoplasmáticas, tais como endossomo e retículo endoplasmático. Especificamente, TLR3 detecta RNA de fita dupla (dsRNA), enquanto que TLR7 e 9 reconhecem RNA de fita simples (ssRNA) em humanos e DNA com motivos CpG, respectivamente.

Notadamente, muitos receptores inatos são descritos como capazes de reconhecer DNA proveniente de lesão celular, entre eles, alguns TLRs ou NLRPs como o TLR2, 4 ou 9 ou AIM-2, respectivamente, entre outros, (ZHANG *et al.*, 2010; COSSARIZZA *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2011), podendo atuar como possíveis reguladores da produção de mediadores, contribuindo para a efetividade da resposta imune inata durante a dengue. De fato, muito tem sido discutido sobre o reconhecimento de padrões moleculares associados à lesão (DAMPs) por TLR9 em inúmeros modelos experimentais em que há comprometimento hepático e liberação de peptídeos mitocondriais. (ZHANG *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2012).

Uma vez ativado, TLR9 induz a produção de IFN-I e outras citocinas pró-inflamatórias normalmente por vias dependentes de MyD88. (AKIRA *et al.* 2006, BLASIUS *et al.*, 2010, KAWAI & AKIRA, 2011). Essa molécula adaptadora ativa uma cascata de quinases que culmina na ativação de IRF7 e NF- κ B. A ativação de IRF7 leva a transcrição de IFNs do tipo I que são representados pelos subtipos múltiplos de IFNs- α (14 – 20 dependendo da espécie), pelos IFN- β , IFN- ω , IFN- τ , IFN- κ e IFN- ϵ . Todos, geneticamente e estruturalmente muito similares. Eles apresentam como característica básica a capacidade de ligação a um receptor heterodimérico comum: o IFNAR, compreendido pelas cadeias IFNAR1 e IFNAR2. Essas citocinas são secretadas em níveis reduzidos por quase todos os tipos celulares, todavia os fibroblastos compreendem as maiores fontes celulares de IFN- β e as células hematopoiéticas dos IFNs dos tipos IFN- α e IFN- ω . As infecções virais são os estímulos clássicos para a expressão dos IFN- α e IFN- β , além de NF- κ B, por esses receptores. (SEN, 2001; SCHRODER *et al.*, 2004; BOXEL-DEZAIRE *et al.*, 2006). A ILUSTRAÇÃO 7 descreve com detalhes a ativação de TLR9 pelo seu ligante.

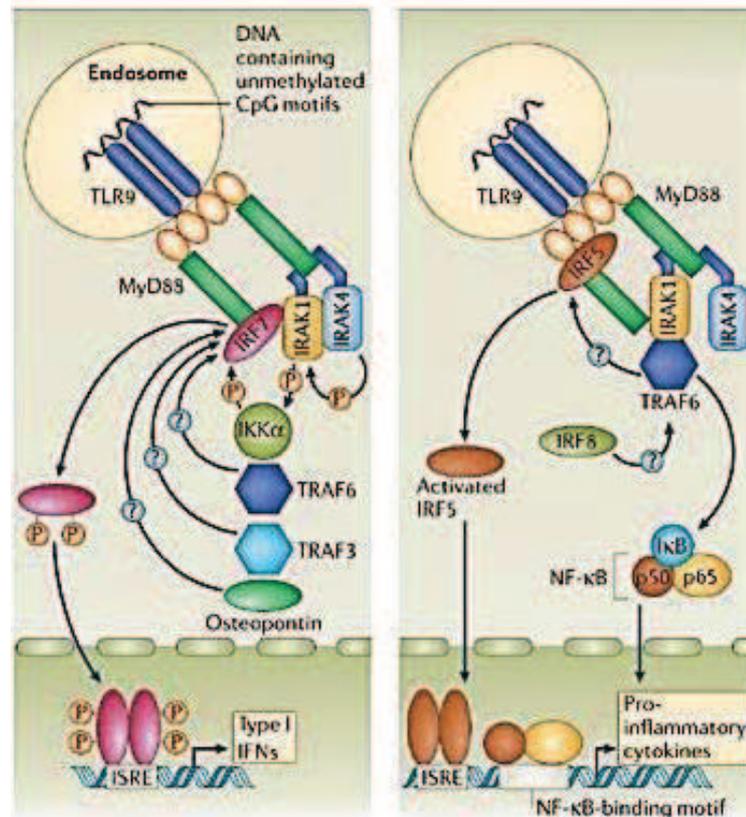


ILUSTRAÇÃO 8: Vias de sinalização de TLR9 e indução de IFN-I e outras citocinas inflamatórias. O recrutamento de MyD88 é importante para induzir IFN-I e respostas inflamatórias através da ativação de IRF7 e NF- κ B, respectivamente. MyD88 forma um complexo de sinalização com IRAK1, IRAK4, IKK α , TRAF3, TRAF6, OPN-i e IRF7. Em resposta à estimulação do ligante, IRF7 é fosforilada por IRAK1 e IKK α e transloca-se para o núcleo para regular a expressão dos genes IFN tipo I, especialmente de IFN- α . TRAF3, IRAK1, IKK α e OPN-i, que são indispensáveis para a ativação de IRF7, mas dispensáveis para a ativação do NF- κ B, no entanto, IRAK4 e TRAF6 são indispensáveis tanto para ativação de NF- κ B e IRF7 (Adaptado de HONDA & TANIGUSHI, 2006).

1.1.11. A ativação de TLR9 e a indução de IFN- γ

De forma geral, a ativação de NF- κ B por TLRs induz a produção de várias citocinas inflamatórias como interleucinas do tipo 1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-18) e IL-12 (AKIRA *et al.*, 2001; IWASAKI & MEDZHITOV, 2004). Dessa maneira, a sinalização dependente de TLR9 pode induzir a ativação de outros tipos celulares considerados da

imunidade inata, como células NK (HAEBERLEIN *et al.*, 2010), mas também pode tornar-se uma “ponte” para a transição da resposta imune inata à adaptativa, uma vez que a indução de citocinas como IL-12 ou IL-18 por esse receptor induz a resposta imune do tipo Th1 (IWASAKI & MEDZHITOV, 2004; EDWARDS *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2005). Esse processo pode amplificar a resposta pró-inflamatória, induzindo a produção de outras citocinas como IFN- γ (FANTUZZI *et al.*, 1999; PUDDU *et al.*, 1997; TOMINAGA *et al.*, 2000; SASAKI *et al.*, 2004; FAGUNDES *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013). IFN- γ é produzido principalmente por células NK, linfócitos T CD4⁺ auxiliares ativados do tipo Th1 e linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs) (IWASAKI & MEDZHITOV, 2004; EDWARDS *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2005). Entretanto, já é bem aceito que outros tipos celulares como os linfócitos B e algumas células apresentadoras profissionais de antígenos (APCs) também possam secretar essa citocina em certas circunstâncias (SCHRODER *et al.*, 2004).

Desde os primeiros estudos clínicos, níveis elevados de IFN- γ foram observados nos pacientes com FD e FHD em relação àqueles indivíduos saudáveis (KURANE *et al.*, 1994). CHEN e colaboradores, (2006), relataram em seu estudo, que indivíduos tailandeses adultos sobreviventes de infecção pelo vírus da dengue possuíam níveis circulantes de IFN- γ elevados em relação àqueles indivíduos que sucumbiram à infecção. Os modelos animais também sugerem a participação dessa citocina na resposta do hospedeiro à infecção (SHRESTA *et al.*, 2004a; SHRESTA *et al.*, 2004b; SHRESTA *et al.*, 2006; FAGUNDES *et al.*, 2011, COSTA *et al.*, 2012). O IFN- γ tem sua sinalização e controle da expressão gênica mediada primariamente pela via Jak-STAT (SCHRODER *et al.*, 2004). A sinalização dessa via envolve recrutamento seqüencial de receptores e a ativação de membros das famílias das Janus cinases (Jaks: Jaks 1-3 e Tyk2) e da família dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição

(STATs: Stats 1-6, incluindo a Stat5a e Stat5b) para o controle transcricional de genes alvos via elementos de resposta específicos (SCHRODER *et al.*, 2004). A ILUSTRAÇÃO 8 representa esquematicamente a ativação do receptor de IFN- γ pelo seu ligante e suas vias de sinalização.

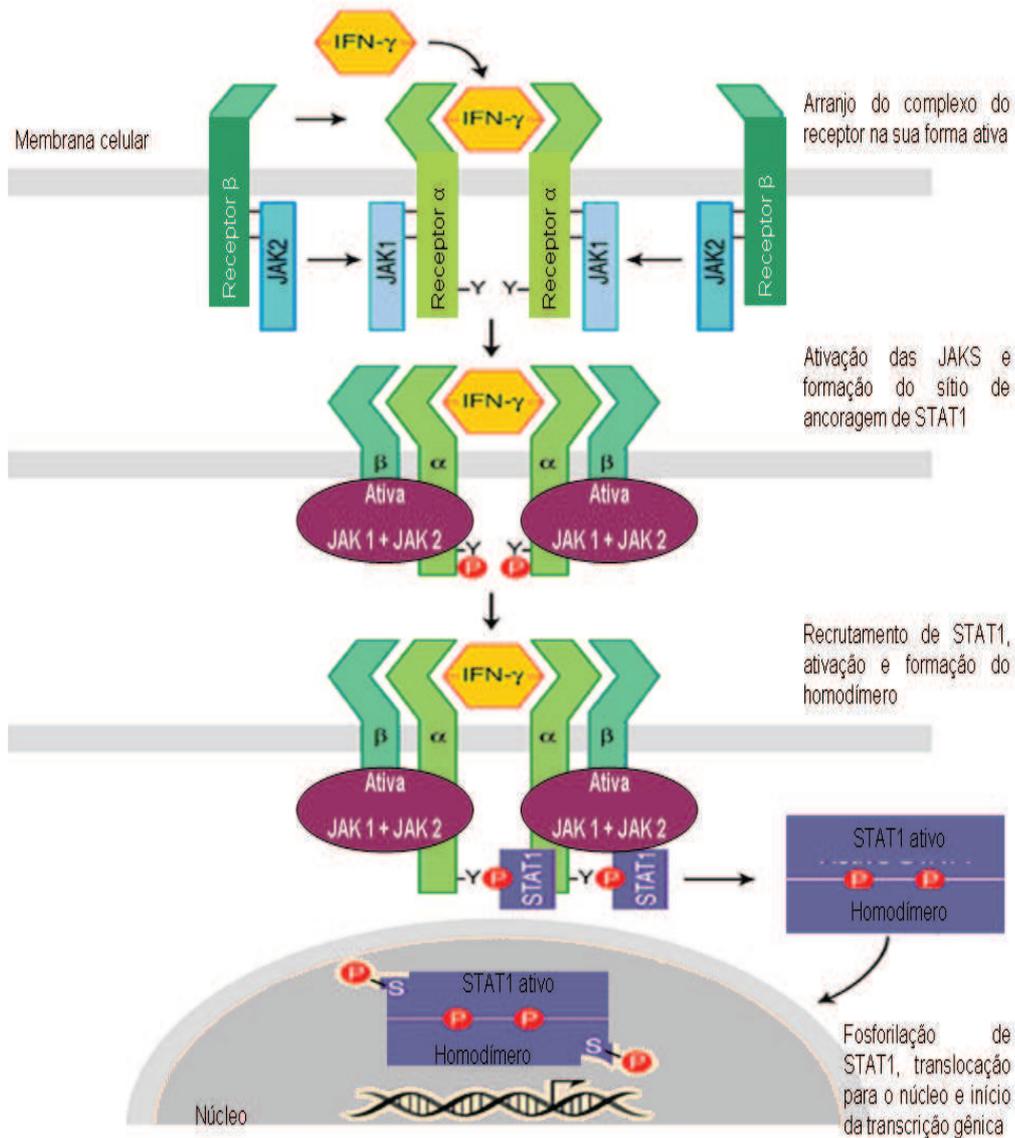


ILUSTRAÇÃO 9: Representação esquemática da ativação do receptor de IFN- γ pelo seu ligante e suas vias de sinalização. O dímero de IFN- γ se liga a cadeia IFNR1 na proporção estequiométrica de 2:2, levando à auto-fosforilação e ativação da Jak2. Jak1 e Jak2 são pré-associadas com os receptores IFN γ R1 e IFN γ R2, respectivamente; e a oligomerização do receptor é responsável pela aproximação dessas cinases, permitindo a trans-fosforilação de cada uma das cinases e dos domínios citoplasmáticos do receptor. Jak1, então, fosforila dois resíduos chaves de tirosina nas duas cadeias de

IFNGR1, formando dois sítios de ancoragem para moléculas Stat1. O par de moléculas Stat1 recrutado é fosforilado, possivelmente por Jak2, levando à sua dissociação do receptor e translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, o homodímero se liga a elementos promotores, iniciando ou suprimindo a transcrição de genes. Muitos dos genes induzidos são também fatores de transcrição (por exemplo, IRF-1, IRF-2 e IRF-9), que são ativados por IFN- γ e são capazes de regular uma nova onda de transcrição. (Adaptado de CAMBRIDGE PRESS)

Dentre os diversos mecanismos antivirais desempenhados por IFN- γ , podemos destacar a indução de algumas enzimas, mais notavelmente a PKR, uma cinase ativada por moléculas de RNA de dupla-fita, intermediários comuns durante o ciclo de replicação de vírus constituídos por genoma de RNA (SCHRODER *et al.*, 2004). A fosforilação de alguns substratos por essa enzima inibe a síntese de proteínas, tanto do hospedeiro, quanto virais, inibindo a sua replicação (SCHRODER *et al.*, 2004). Além disso, os diversos efeitos pró-apoptóticos e inibidores do crescimento celular desempenhados por essa citocina, também podem ser responsáveis pelo combate à replicação viral e à disseminação da infecção pelo vírus da dengue (SCHRODER *et al.*, 2004).

Devido ao amplo espectro de respostas celulares atribuídos ao IFN- γ , parece razoável considerar a ela parte da função de regulação do sistema imune e o controle da dengue. Nesse contexto, nosso grupo tem trabalhado extensamente durante os últimos anos na busca de entendimento sobre a participação de IFN- γ na dengue experimental. Dessa forma, resultados publicados nos últimos três anos em que foram utilizadas cepas de DENV-2 e DENV-3 adaptadas ao hospedeiro murino demonstraram que camundongos deficientes na expressão dessa citocina são mais susceptíveis a infecção pelo vírus da dengue, exibindo taxas altas de letalidade e o desenvolvimento de uma resposta inflamatória intensa, seguida de incapacidade de contenção da replicação viral. (FAGUNDES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012).

1.1.12. O papel de IFN- γ na indução de espécies reativas

Um dos efeitos mais bem descritos do IFN- γ durante processos infecciosos é a capacidade de ativação das funções microbicidas efetoras de macrófagos, células dendríticas (DCs) e neutrófilos (SCHRODER *et al.*, 2004; GOUGH *et al.*, 2008). Nessas populações, a atividade microbicida relacionada à IFN- γ inclui a indução de expressão de várias enzimas que induzem componentes relacionados a processos fagocíticos (DECKER *et al.*, 2002). Nesse contexto, nós demonstramos que IFN- γ participa da resistência do hospedeiro à infecção pelo vírus da dengue em parte pela geração de espécies reativas de nitrogênio (RNS) como o óxido nítrico (NO). (FAGUNDES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012). Essa espécie é um gás com curto tempo de meia vida produzido a partir de uma reação catalisada pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) que pode ser encontrada sob três isoformas, denominadas de NOS1 ou neuronal (nNOS), NOS2 ou induzida (iNOS) e NOS3 ou endotelial (eNOS). Apenas a isoforma NOS2 é expressa sob indução de citocinas e/ou estímulos microbianos. As demais isoformas são expressas constitutivamente em baixos níveis e podem, rapidamente, ser ativadas pelo aumento do cálcio citoplasmático na presença de calmodulina. Em contraste, nenhum aumento intracelular de cálcio é necessário para a ativação da NOS2 (MACMICKING *et al.*, 1997; GARCIA & STEIN, 2006).

Porém, as ações antivirais efetoras de IFN- γ em diversos tipos de infecções não se restringem apenas a síntese de NOS2 como produto final. Sabe-se que essa citocina também é capaz de induzir a expressão de vários outros genes em resposta a inúmeros patógenos (SAMUEL & OZATO, 1996). Neste contexto, os fagócitos usualmente eliminam os agentes infecciosos através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (MACMIKING *et al.*, 1997). Além disso, o NO pode reagir

em água com o oxigênio e/ou seus intermediários reativos para gerar outros radicais (ex: NO_2), ânions moderadamente estáveis (NO_2^-), ânions muito estáveis (NO_3^-), óxidos altamente instáveis (N_2O_3) e peróxidos instáveis como o Peroxinitrito (ONOO^-) (MORENO & PRYOR, 1992; BECKMANN *et al.*, 1994; PRYOR & SQUADRITO, 1995; SALGO *et al.*, 1995; RADII *et al.*, 2001; CLAVREUL *et al.*, 2006; SZABÓ *et al.*, 2007).

MAZZI e colaboradores, (2004), descreveram a ação regulatória positiva de $\text{IFN-}\gamma$ sobre $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (ou NOX1), em monócitos isolados de camundongos. Essa proteína faz parte do complexo NADPH-Oxidase, presente principalmente em fagócitos e uma vez ativado, induz a produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em resposta ao estímulo infeccioso (BYLUND *et al.*, 2010). A indução de $\text{gp91}^{\text{phox}}$ em células fagocíticas é dependente da fosforilação de uma proteína de ligação de sequencia consensa de IFN (ICSBP). Essa proteína interage com o gene promotor *CYBB*, responsável pela codificação de $\text{gp91}^{\text{phox}}$. Dessa forma, a ativação de ICSBP ocorre de maneira dependente de JAK2, uma vez que essa proteína adaptadora é ativada pela ligação de $\text{IFN-}\gamma$ ao seu receptor nessas células, sendo esse processo necessário e suficiente para induzir a transcrição de $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (KAKAR *et al.*, 2005). A proteína p22^{phox} , outro componente que participa da montagem do complexo NADPH-Oxidase em diversos tipos celulares, também é induzida por $\text{IFN-}\gamma$ (MORIWAKI *et al.*, 2006). As ações subsequentes de JAK2 resultam na fosforilação de STAT1 e 2 e essas proteínas ativadas podem induzir $\text{gp91}^{\text{phox}}$ e p22^{phox} em resposta a estímulos específicos (MORIWAKI *et al.*, 2006). A ILUSTRAÇÃO 9 representa esquematicamente a regulação de $\text{gp91}^{\text{phox}}$ e p22^{phox} por $\text{IFN-}\gamma$.

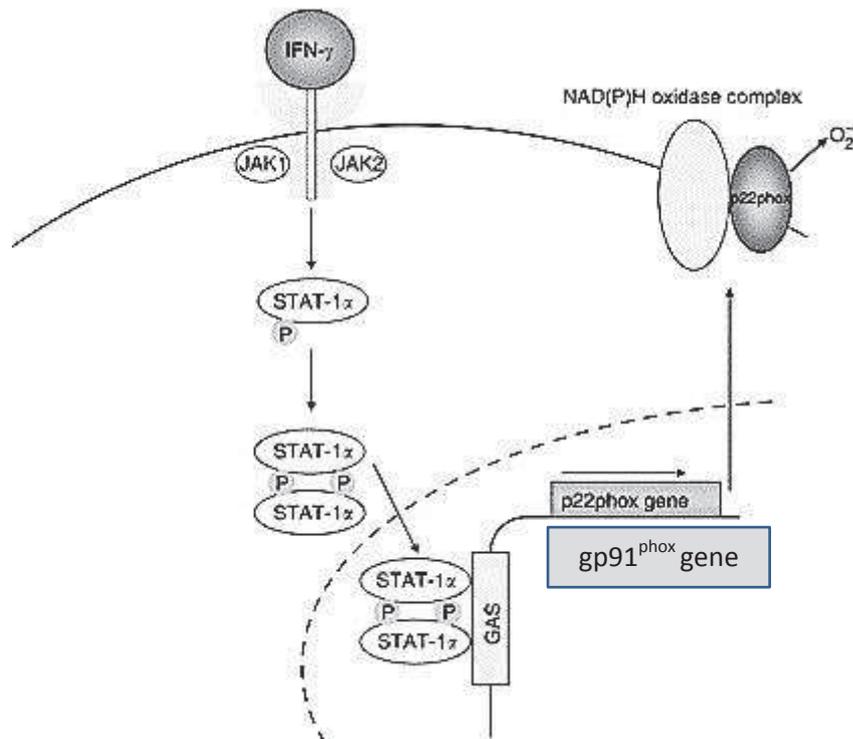


ILUSTRAÇÃO 10: Representação esquemática da regulação do gene que codifica a proteína p22^{phox} e gp91^{phox} por IFN-γ e suas vias de sinalização. IFN-γ induz a via JAK/STAT para ativar o fator de transcrição nuclear GAS no núcleo celular. Esse fator ativado induz a transcrição de p22^{phox} e gp91^{phox} que participam da montagem do complexo NADPH-Oxidase e geração de superóxido. (Modificado de MORIWAKI *et al.*, 2006)

1.1.13. Química das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: a geração de Peroxinitrito

A geração de O₂⁻ tem sido relacionada a múltiplos processos fisiológicos e patológicos de maneira similar ao NO (DRÖGE, 2002). Entretanto, muitas evidências sugerem que alguns dos efeitos atribuídos a essas espécies podem ser mediados pela geração de peróxidos instáveis como o ONOO⁻ (MORENO & PRYOR, 1992; BECKMANN *et al.*, 1994; PRYOR & SQUADRITO, 1995; SALGO *et al.*, 1995; RADI *et al.*, 2001; CLAVREUL *et al.*, 2006; SZABÓ *et al.*, 2007).

O ONOO⁻ é uma espécie oxidante resultante da reação do NO e O₂⁻ possuindo curto tempo de meia vida. Apesar do NO ser uma espécie relativamente estável e altamente difusível, o O₂⁻ tem tempo de meia vida curto e não se difunde facilmente em membranas biológicas. Dessa forma, a geração de ONOO⁻ ocorre preferencialmente em locais associados à geração de O₂⁻ como a membrana plasmática, o complexo NADPH-Oxidase e a cadeia respiratória mitocondrial (SZABÓ *et al.*, 2007). Entre as várias ações atribuídas ao ONOO⁻, merecem destaque: a exacerbação da sinalização de mediadores e aumento da reposta inflamatória (ZOUKI *et al.*, 2001a-b; MATATA *et al.*, 2001; JANG *et al.* 2006), migração leucocitária (ZINGARELLI, *et al.*, 1998; SOHN *et al.*, 2003; PLATT *et al.*, 2005), disfunção energética celular (RADI *et al.*, 1994; RADI, *et al.*, 2002; SZABÓ *et al.*, 2003) e indução da morte celular por necrose e apoptose (GROVER *et al.*, 2003; CHAKRABORTI *et al.*, 2004; GUTIERREZ-MARTIN *et al.*, 2005). Essas ações descrevem o ONOO⁻ como agente “maléfico” ao hospedeiro durante vários processos infecciosos e inflamatórios (CHAREONSIRISUTHIGUL *et al.*, 2007; SZABÓ *et al.*, 2007; UBOL *et al.*, 2008 a, b), o que poderia contribuir para a progressão da dengue e o desenvolvimento das formas graves da doença como a FHD/SCD (CHATURVEDI & NAGAR, 2009).

Porém, em baixas concentrações o ONOO⁻ pode exercer efeitos benéficos durante certas infecções por vírus. Sabe-se que essa espécie pode inibir a entrada de alguns enterovirus em células HeLa prejudicando dessa forma a replicação viral e futuras infecções que seriam recém-formadas (PADALKO *et al.*, 2004). Além disso, o ONOO⁻ é capaz de inibir a formação de vírions livres maduros de Hantavirus em células VERO E6 (KLINGSTRÖM *et al.*, 2006). Entretanto, suas possíveis ações no controle da replicação do vírus da dengue ainda não foram amplamente investigadas.

1.2. Um novo modelo animal para o estudo da dengue e a possibilidade de novas perspectivas sobre a doença

A maioria dos modelos experimentais hoje utilizados não reproduz de maneira fidedigna as características da infecção pelo dengue vista em humanos (ROTHMAN, 2003). Além de não mimetizar as características fisiopatológicas da doença humana, os modelos animais utilizados atualmente usam inóculos com altas cargas virais, o que levam 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 (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 hipernocicepção, outro sintoma marcante da patologia humana mais branda.

O modelo em questão parece ser uma ferramenta interessante para o estudo da patofisiologia da infecção pelo dengue, dessa forma, neste estudo, utilizamos esse modelo experimental para compreender os mecanismos envolvidos na resistência do

hospedeiro à infecção pelo vírus da dengue (ATRASHEUSKAYA et al., 2003; ASSUNCAO-MIRANDA et al., 2010).

1.3. Considerações sobre o estudo proposto

O papel de radicais livres durante processos infecciosos virais é controverso e pouco elucidado. Tampouco são coerentes os mecanismos pelos quais esses processos podem ser desencadeados após a infecção pelo vírus da dengue ou a sua contribuição à patogênese ou resistência do hospedeiro à doença.

Todas as informações levantadas até aqui nos permitem concluir que frente à infecção pelo vírus da dengue, o hospedeiro pode responder estabelecendo uma resposta inflamatória adequada e assim é capaz de lidar com o patógeno e eliminar o mesmo, mas por outro lado, pode desencadear uma resposta inflamatória exacerbada e alterada, potencialmente lesiva. Nesse contexto, a indução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio parece ser a chave para o desenvolvimento dessas respostas. Dessa maneira, essas espécies produzidas de maneira descontrolada poderiam induzir processos potencialmente lesivos. Porém, em concentrações ideais poderiam contribuir para a efetividade da resposta ao inibir a replicação viral.

Neste trabalho, focamos a participação de TLR9 e de moléculas que direta ou indiretamente dependem da ativação dessa via no controle da replicação viral. Mesmo durante a dengue clássica a instalação de um processo inflamatório induz a morte celular e a liberação de produtos derivados de necrose e apoptose podendo estabelecer um mecanismo inflamatório de proteção do hospedeiro ao desenvolvimento da doença grave. Esse perfil inflamatório “benéfico” participa da resistência do hospedeiro à de maneira dependente da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, o que poderia ocorrer durante a doença leve, já que há lesão celular nesse período. Assim a

ativação da imunidade inata dependente de TLR9 tem todas as condições de ocorrer nesse período induzindo uma resposta ao primeiro sinal de lesão. Dessa forma, podemos sugerir que o conhecimento da participação desse receptor e das possíveis vias que ele pode ativar durante a progressão da dengue é fundamental para o desenvolvimento de estratégias farmacológicas contribuindo para a efetividade do tratamento da doença.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

Aproximadamente 230 milhões de infecções anuais, 25.000 casos fatais e cerca de 3,6 bilhões de pessoas sobre o risco iminente de infecção em todo o mundo. (WILDER-SMITH *et al.*, 2012a-b). Uma média de 2.1 bilhões de dólares gastos por ano nas Américas (SHEPARD *et al.*, 2011) e 950 milhões no sudoeste asiático (SHEPARD *et al.*, 2013) Apesar disso, ainda não existem vacinas disponíveis. O tratamento sintomático apropriado é a opção de escolha e determinante para a redução no número de casos graves que podem evoluir para o óbito (WHITEHEAD *et al.*, 2011). O principal meio de prevenção é o controle do mosquito vetor, um método dispendioso e geralmente ineficaz, como pode ser comprovado pela expansão do número de casos ocorridos nas últimas décadas. (MURPHY & WHITEHEAD, 2011; FAGUNDES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013; ST JOHN *et al.*, 2013).

Como discutido anteriormente, uma resposta inflamatória exacerbada durante a infecção pelo vírus da dengue para impactar diretamente no hospedeiro favorecendo o desenvolvimento dos quadros mais graves (FHD/SCD), ao passo que uma resposta adequada, está associada aos quadros mais brandos da doença (FD) (GARCIA *et al.*, 2010; FAGUNDES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013). Nesse sentido, estudos direcionados a compreender os mecanismos associados ao desenvolvimento da doença grave e aqueles associados à proteção do hospedeiro frente à infecção são necessários e bastante relevantes, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de novas terapias contra esse importante patógeno humano.

Ainda, apesar do avanço no conhecimento dos mecanismos da resposta imune inata, pouco conhecimento há disponível, sobre a participação de receptores do tipo *toll9* e dos mediadores que são gerados pela sua sinalização durante a dengue, tampouco

os mecanismos que desencadeiam a sua ativação durante a doença e sua relação com a morte celular.

Além disso, já é demonstrado que citocinas como IFN- γ contribuem para a resistência do hospedeiro, em parte pela indução de NOS2 (FAGUNDES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012). Por outro lado, a resposta desencadeada por IFN- γ parece contemplar outros fatores até então desconhecidos durante a dengue como a geração de O_2^- e $ONOO^-$, tornando-se assim necessário o entendimento mais amplo destes mecanismos de forma mais abrangente.

Assim, o objetivo geral deste trabalho **foi estudar os mecanismos de ativação e a participação de receptores do tipo *toll9* e avaliar os mecanismos de indução e a participação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a dengue.**

Mais especificamente, o trabalho aqui exposto contemplou os seguintes objetivos:

2.1. Objetivo específico I

Avaliar a liberação de mediadores inflamatórios e a liberação de produtos derivados de morte celular em pacientes com diagnóstico confirmado de dengue clássica e pacientes febris de origem multifatorial.

- Avaliar a produção de IL-1 β , PTX3, sTNFR1 e sTNFR2 no soro de pacientes com diagnóstico de dengue confirmado e de pacientes febris de origem multifatorial correlacionando os achados aos dias de sintoma da doença.
- Avaliar a produção de IL-6, TNF- α , IL-10 e IL-4 em sobrenadante de cultura de PMBCs de pacientes com diagnóstico de dengue confirmado e de indivíduos saudáveis após estimulação com proteína E viral.

- Avaliar os níveis de DNA mitocondrial no soro de pacientes com diagnóstico de dengue confirmado e de pacientes febris de origem multifatorial correlacionando os achados aos dias de sintoma da doença.

2.2. Objetivo específico II

Avaliar os mecanismos de ativação e a participação de receptores do tipo *toll9* durante a dengue experimental em camundongos.

- Avaliar os níveis de DNA mitocondrial livre no soro de camundongos após a infecção pelo DENV-3;
- Verificar a participação de TLR9 durante a dengue experimental através da análise dos parâmetros de doença e medida dos níveis de citocinas e espécies reativas em animais TLR9^{-/-} infectados com DENV-3;

2.3. Objetivo específico III

Avaliar o mecanismo de indução e a participação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a dengue experimental em camundongos.

- Determinar os níveis de ROS e ONOO⁻ e da expressão de gp91^{phox} durante a dengue experimental através do uso de técnica de marcação por fluorimetria e Real Time PCR, respectivamente, em esplenócitos isolados de camundongos infectados com DENV-3;
- Verificar a participação do complexo NADPH-oxidase e da produção de ROS por essa via durante a dengue experimental através da análise dos parâmetros de doença e medida dos níveis de citocinas e espécies reativas em camundongos gp91^{phox-/-} ou tratados com Apocinina e infectados com DENV-3;

- Verificar o papel da citocina IFN- γ no controle da expressão de gp91^{phox} e na regulação da geração de ROS e ONOO⁻ durante a dengue experimental através do uso de técnica de marcação por fluorimetria e Real Time PCR, respectivamente, em esplenócitos isolados de camundongos IFN- γ ^{-/-} infectados com DENV-3;
- Estudar o efeito da ação sinérgica de NO e superóxido durante a dengue experimental através da análise dos parâmetros de doença e medida dos níveis de citocinas e espécies reativas em camundongos NOS2^{-/-} tratados com Apocinina e infectados com DENV-3;
- Estudar o efeito da decomposição rápida de ONOO⁻ durante a dengue experimental através da análise dos parâmetros de doença e medida dos níveis de citocinas e espécies reativas em camundongos selvagens tratados com FeTPPs e infectados com DENV-3;

2.4. Objetivo específico IV

Avaliar a capacidade antiviral do Peroxinitrito em cultura de células LLC-MK2 infectadas com DENV-3.

- Estudar o efeito do ONOO⁻ com agente antiviral através do uso de SIN-1, um doador de ONOO⁻, em células LLC-MK2 infectadas com DENV-3 e posterior análise da carga viral pela técnica de titulação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Voluntários e amostras

Em 2009, todo o protocolo experimental referente ao objetivo específico citados no item 2.1 foi submetido à avaliação pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas-UFMG e da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Belo Horizonte. A aprovação para a realização da pesquisa foi concedida em julho de 2009 e as atividades de recrutamento de voluntários e coletas de amostras iniciaram em 2010 no período em que seria mais provável elevada incidência de casos suspeitos dengue (entre as semanas epidemiológicas 1 e 17) conforme observado na ILUSTRAÇÃO 10.

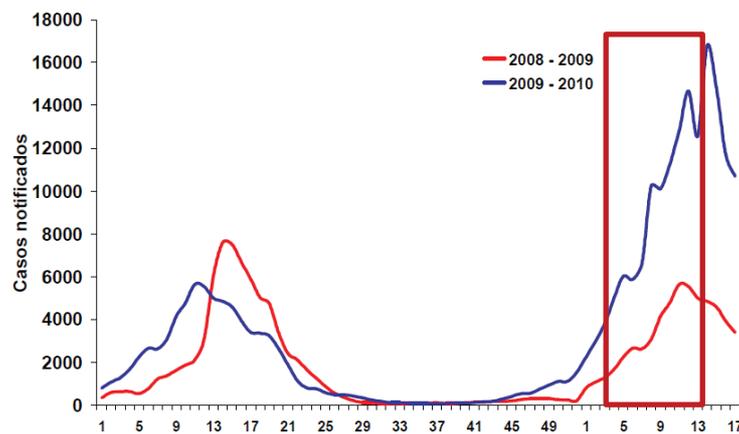


ILUSTRAÇÃO 10: Casos notificados de dengue por semana epidemiológica em Minas Gerais, 2008 - 2010. Fonte: Sinan/SES-MG

Foram selecionadas duas unidades básicas de saúde (UBS) na região norte de Belo Horizonte, onde pacientes que apresentaram quadro clínico agudo suspeito de dengue foram convidados a participar do estudo. 181 voluntários foram incluídos na pesquisa entre os dias 18 de janeiro e 30 de março de 2010 (período entre a 3ª e 13ª semanas epidemiológicas). Foram incluídos indivíduos com no mínimo 18 anos de idade pesando 50 quilos ou mais. Foram excluídos: mulheres grávidas, pacientes em uso de drogas imunossupressoras e pacientes, cujas condições hemodinâmicas não

permitiriam a retirada da quantidade previamente estipulada de sangue, como os gravemente anêmicos ou em choque grave necessitando aminas vaso-ativas ou em crise hipertensiva.

Após concederem consentimento informado para participação na pesquisa, os voluntários responderam a um questionário sobre o quadro sintomático apresentado, história clínica prévia, comorbidades, uso de medicamentos e cederam como amostra 12ml de sangue para as análises propostas na pesquisa. Os voluntários receberam atendimento médico de acordo com o Protocolo de Atendimento aos Pacientes com Suspeita de Dengue definido pela Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte. Os métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da infecção pelo dengue foram RT-PCR, ELISA de captura para IgM anti-dengue (MAC-ELISA-PanBio) e detecção de NS1 pelo imunoensaio Platelia™ Dengue NS1 AG (Biorad). Os ensaios de ELISA foram realizados conforme as instruções do fabricante. Para a execução desses testes foram utilizadas amostras de soro. O RT-PCR e o ensaio para detecção do NS1 foram realizados em amostras coletadas no primeiro dia em que o paciente compareceu à UBS após o início dos sintomas. O MAC-ELISA foi realizado nas amostras coletadas no 6º dia após o início dos sintomas. No primeiro dia em que o paciente compareceu à unidade de saúde foi também quantificado o hematócrito e o número de plaquetas no sangue.

3.2. Extração de RNA viral e RT- PCR para detecção de dengue

O RNA viral foi extraído utilizando-se 140 µl de soro com o kit QIAGEN QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando-se 400ng do RNA viral extraído, 5U/µl de MMLV Reverse Transcriptase em tampão padronizado (Promega, Madison, Wis) e o

primer reverso 5' GGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCT 3') a 42°C por 2 horas. As PCR em tempo real foram realizadas em um volume total de 20 µl em uma placa de 96 poços (Applied Biosystems™) contendo 10µl de Power SYBR Green PCR Master Mix, 2,5ng dos primers senso (5'TTGAGTAAACYRTGCTGCCTGTAGCTC 3') e do antisenso (5' GGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCT 3') da região genômica NS1 do DENV, descrito previamente por CHIEN *et al.*, 2006. O PCR em tempo real foi realizado no aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), usando o programa padrão do sistema para SYBR green: 10 minutos para pré-incubação a 95°C seguido de 40 ciclos (15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C). Ao fim de cada reação, o *cycle threshold* (Ct) foi utilizado no nível que correspondia ao melhor parâmetro cinético do PCR e as curvas de *melting* foram obtidas e analisadas.

3.3. Determinação dos níveis séricos e em sobrenadante de cultura de PBMC de marcadores imunológicos nas amostras humanas

A determinação de marcadores imunológicos foi realizada por meio de ensaios de ELISA utilizando-se kits de anticorpos adquiridos do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA) conforme as instruções do fabricante. As concentrações de IL-1β, PTX3, sTNFR1, sTNFR2 foram mensuradas nas amostras de soro. A dosagem da concentração de TNF-α, IL-6, IL-4, IL-10 e IFN-γ foi realizada no sobrenadante de cultura de PBMC isoladas de amostras de sangue. Ambas as amostras foram obtidas no primeiro dia de atendimento dos pacientes na unidade de saúde e a concentração de citocinas mensurada pela técnica de ELISA *sandwich*, utilizando-se kits de anticorpos adquiridos do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA) e seguindo o protocolo recomendado, resumidamente descrito abaixo.

Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorreu durante 18 horas à 4° C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma) por pelo menos 1 hora. As amostras, o padrão e o branco acrescentados aos seus respectivos poços. As placas foram incubadas e guardadas na geladeira “overnight”. O anticorpo de detecção adicionado aos poços por pelo menos 2 horas. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingem” - 1:4000) e revelada com “OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*” - Sigma). Após 30 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos como pg per mL e média ± erro padrão.

3.4. Obtenção de células mononucleares.

O sangue coletado para a separação de células mononucleares foi diluído em volume igual de solução salina estéril (8ml). Após leve homogeneização, o sangue diluído foi sobreposto cuidadosamente sobre 4mL de Ficoll (Amersham, USA) e centrifugado em temperatura ambiente a 800g por quarenta minutos. O anel de células mononucleares (PBMC) foi transferido para tubos novos contendo solução salina à temperatura ambiente e centrifugado três vezes a 800g por 10 minutos.

3.5. Cultura de células mononucleares

O sedimento com as células mononucleares foi recuperado em 1 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO BLR Life Technologies) suplementado com 10% SBF (Nutricell), L-glutamina (Sigma Chemical Co.) a 2 mM, penicilina cristalina a 100 U/mL,

estreptomicina a 100 µg/mL (GIBCO BLR Life Technologies) e 50 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.). A viabilidade das células foi verificada com azul de tripan em microscópio e a contagem realizada utilizando a Câmara de Neubauer. As células foram colocadas em cultura na quantidade de 5×10^6 células/mL em placas de 24 poços. As células foram cultivadas na presença ou ausência de antígeno de dengue produzido em sistema procarioto, (proteína de envelope (E) de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, 0,3 µM) desenvolvido e produzido pela Dr.^a Dra. Jaquelline Germano de Oliveira, centro de Pesquisa René Rachou – BH e cedido gentilmente pela Prof.^a Erna Geessien Kroon, ICB-UFMG, durante 48 horas e o sobrenadante coletado para análise das concentrações de IL-6, TNF- α , IL-10, IL-4 e IFN- γ .

3.6. Dosagem de DNA mitocondrial no soro de pacientes com diagnóstico prévio de dengue e de camundongos infectados com DENV-3

A concentração de mtDNA foi estimada por meio de PCR em tempo real para o gene mitocondrial NADH deh. Foi utilizado o *Thermo Scientific Fermentas Genomic DNA Purification Kit* (Waltham, MA, USA), conforme as instruções do fabricante para extração do DNA total e amostras de soro coletadas no primeiro dia em que os pacientes compareceram ao centro de saúde foram analisadas. Em um segundo passo, amostras de soro de camundongos infectados com DENV-3 foram utilizadas. As PCR em tempo real foram realizadas em um volume total de 10 µl em uma placa de 96 poços (Applied Biosystems™) contendo 5µl de Power SYBR Green PCR Master Mix, 2,5ng dos primers senso e do antisenso. O PCR em tempo real foi realizado no aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), usando o programa padrão do sistema para SYBR green: 10 minutos para pre-incubação a 95°C seguido de

40 ciclos (15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C). Ao fim de cada reação as curvas de *melting* foram obtidas e analisadas e o *cycle threshold* (Ct) obtido para cada amostra foi correlacionado com uma curva padrão de mtDNA extraída de fígado de camundongos, obtendo-se a concentração de mtDNA na amostra de soro. Os seguintes pares de primers foram utilizados: Hs NADH des, 5'-ATACCCATGGCCAACCTCCT-3' (forward) e 5'-GGGCCTTTGCGTAGTTGTAT-3' (reverse); Mm NADH des 5'-TCGGAAGCCTCGCCCTCACA-3' (forward) e 5'-GGCTCAGGCGTTGGTGTTC-3'(reverse). Hs – Homo sapiens; Mm – Mus musculus.

3.7. Vírus

Para estudos em camundongos, foi utilizado o sorotipo 3 do vírus da dengue, previamente adaptado ao hospedeiro murino como descrito por COSTA e colaboradores, 2012.

3.8. Animais e protocolos experimentais

Antes do início dos experimentos em animais, todo o protocolo experimental referente aos objetivos específicos citados nos itens 2.2, 2.3 e 2.4 foi enviado CETEA/UFMG e aprovado sob o número 113/09. Para todos os experimentos foram utilizados camundongos machos ou fêmeas com idade entre 8 e 10 semanas.

Para o cumprimento do item 2.2, camundongos selvagens da linhagem C57BL/6J e animais TLR9^{-/-}, foram obtidos do centro de bioterismo do *Laboratoire d'Immunologie et Embryologie Moléculaires* – CNRS, *Orléans*, França). Além disso, alguns animais selvagens da linhagem C57BL/6J e animais TLR9^{-/-}, foram obtidos do centro de bioterismo do instituto René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte, Brasil, gentilmente cedidos pelo Dr. Alexandre M. Vieira Machado.

Os animais foram infectados pela injeção de 10PFU do vírus por via i.p. Posteriormente, para análise dos sinais clínicos, parâmetros inflamatórios e morfológicos da doença e a marcação de células NS3+ no fígado, os animais foram sacrificados no 5º e/ou 7º dias após a infecção.

Para o cumprimento do item 2.3, camundongos selvagens da linhagem C57BL/6J foram obtidos do centro de bioterismo da UFMG (CEBIO) e animais IFN- $\gamma^{-/-}$, NOS2 $^{-/-}$ e gp91^{phox $^{-/-}$} foram obtidos do biotério do laboratório de gnotobiologia do ICB – UFMG, gentilmente cedidos pela Prof^a. Leda Vieira do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG. Os animais foram infectados pela injeção de 100PFU do vírus por via i.p. Inicialmente, os animais foram monitorados por 14 dias para obtenção das curvas de letalidade e em outro momento, sacrificados no 5º e/ou 7º dias após a infecção para análise dos sinais clínicos, parâmetros inflamatórios e obtenção do título viral no baço e soro. Para investigação da participação de ROS ou do efeito de sinergismo entre a ação de NOS2 e do complexo NADPH-oxidase durante a infecção, a formação desse complexo foi inibida pela injeção diária de 20 mg.kg⁻¹ de apocinina em animais selvagens ou NOS2 $^{-/-}$. A dose utilizada foi baseada em estudos prévios de DODD-O & PEARSE, (2000).

Em outros experimentos, para catalisação da decomposição do radical ONOO⁻, animais selvagens foram tratados com injeção diária por via i.p. com 5 mg.kg⁻¹ de FeTPPs. A dose utilizada foi baseada em estudos prévios de TORRES-DUEÑAS *et al.*, (2007).

3.9. Análise do índice de hematócrito

Uma pequena amostra de sangue de cada animal foi coletada por meio de um tubo capilar de vidro heparinizado para determinação de micro-hematócrito (Perfecta), o qual

foi centrifugado em uma centrífuga de micro-hematócrito, rotação por 10 minutos (Centrifuge hematocrit HT). Em seguida, foi realizada uma proporção entre o comprimento das porções vermelha (concentração de elementos do sangue) e branca (concentração de plasma), através de uma regra de três simples:

$$\begin{array}{rcl} \text{Branco + Vermelho} & \text{—————} & \text{100\%} \\ \\ \text{Vermelho} & \text{—————} & \text{X} \end{array}$$

Os resultados foram expressos em percentagem e quanto maior o valor obtido, maior a concentração de hemácias no sangue, indicativo de aumento do extravasamento plasmático.

3.10. Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes

Após o sacrifício foram coletados 10 μ L do sangue dos animais. Este volume foi diluído na proporção de 1:100 em solução de oxalato de amônio 1%, incubado por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente 10 μ L colocados na câmara de Neubauer Bright-Line. Após nova incubação de 15 minutos, o número de plaquetas foi quantificado no microscópio óptico invertido utilizando a objetiva de 40X.

3.11. Determinação dos níveis de citocinas em tecidos animais

Para dosagem de citocinas, fragmentos de baço e fígado, foram homogeneizados em PBS contendo inibidor de proteases (0,1 mM “*phenylmethilsulfonyl fluoride*”, 0,1 mM “*benzethonium chloride*”, 10 mM “EDTA” e 20 KI aprotinina A) e 0,05% “*Tween 20*”, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). O sobrenadante foi usado para as dosagens, após centrifugação de 3.000 g

durante 10 minutos à 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). O soro foi obtido a partir do sangue total (15 min à 37° C seguidos de 30 min à 4° C) por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e posteriormente armazenado à -20° C até análise posterior.

As amostras de soro e baço foram analisadas na diluição 1:3 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina, ao passo que as amostras de fígado foram analisadas na diluição 1:5 como previamente padronizadas em nosso laboratório.

Os níveis de IFN- γ , IL-1 β e TNF- α , foram medidos no soro ou no sobrenadante do homogenato de baço e de fígado dos animais através da técnica de ELISA *sandwich*, de acordo com descrição feita nas publicações de SOUZA e colaboradores, 2000a; SOUZA e colaboradores, 2000b) utilizando-se kits de anticorpos adquiridos do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo recomendado, resumidamente descrito abaixo.

Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorreu durante 18 horas à 4° C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma) por pelo menos 1 hora. As amostras, o padrão e o branco acrescentados aos seus respectivos poços. As placas foram incubadas e guardadas na geladeira “overnight”. O anticorpo de detecção adicionado aos poços por pelo menos 2 horas. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingem” - 1:4000) e revelada com “OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*” - Sigma). Após 30 minutos a reação foi interrompida com H₂SO₄. A

leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm.

Os resultados foram expressos de duas maneiras distintas, a saber: experimentos conduzidos no *Laboratoire d'Immunologie et Embryologie Moléculaires* – CNRS, *Orléans*, França foram expressos como pg per 100mg de proteína total. Experimentos conduzidos no Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro do ICB-UFMG foram expressos como pg per g de tecido ou pg per mL de soro. As diferenças na expressão dos resultados visualizadas nesta tese são devido a diferentes métodos utilizados nos locais onde os experimentos foram realizados. Porém, em ambos, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

3.12. Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no baço ou fígado foi obtida pelos ensaios de atividade da mieloperoxidase (MPO) como descrito anteriormente por MATOS *et al.*, 1999. Sumariamente, fragmentos de tecido dos animais infectados ou controles foram removidos e congelados a -20°C . Após o descongelamento, 1 g de tecido foi homogeneizado em 1.9 mL de tampão (pH 4,7) (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO_4 , 0,015 M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA), e centrifugado a 3000 g por 15 minutos (Centrífuga. BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). O precipitado foi submetido à lise hipotônica (15 mL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 s após).

Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão NaPO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de “*hexadecyltrimethylammonium* (HTAB)” 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos

(Tubo 3810, Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 3000 g e os sobrenadantes coletados. As amostras dos tecidos foram diluídas previamente à análise em tampão NaPO_4 0,05 M na razão 1:10.

A atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuspendido foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando “*tetramethylbenzidine*” (1,6 mM) e H_2O_2 (0,5 mM). A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil).

Os resultados foram expressos de duas maneiras distintas a saber: experimentos conduzidos no *Laboratoire d’Immunologie et Embryologie Moléculaires* – CNRS, *Orléans*, França foram expressos como O.D. per 100mg de tecido. Experimentos conduzidos no Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro do ICB-UFMG foram expressos como número total de neutrófilos acompanhado da OD do sobrenadante do tecido e comparados com neutrófilos da cavidade peritoneal igualmente processados. Para tanto, a indução de neutrófilos na cavidade peritoneal foi realizada pela injeção de 3 mL de caseína 5%. Uma curva padrão do número de neutrófilos versus OD foi obtida previamente pelo processamento de neutrófilos purificados (> 95% pureza) como descrito acima e utilizado para a medida de atividade da mieloperoxidase.

As diferenças na expressão dos resultados visualizadas nesta tese são devido a diferentes métodos utilizados nos locais onde os experimentos foram realizados. Porém, em ambos, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

3.13. Ensaio fluorimétrico

Níveis de ROS e ONOO⁻ foram avaliados por ensaios de fluorimetria adaptados de SRIVASTAVA, 2009. Para isso, esplenócitos foram isolados dos baços dos animais em tempos determinados após a infecção e mantidos em meio de cultura RPMI livre de *phenol red*, com 5% de SFB. Em seguida, 1×10^6 células foram incubadas durante 30 minutos a 37°C com 10 uM de 2',7' *diacetate dichlorodihydrofluorescein* (DCF-DA) ou com 5 uM de *dihydrorhodamine 123* (DHR-123) para obtenção da média de intensidade de fluorescência. DCF-DA e DHR-123 são compostos permeáveis à célula, e no meio intracelular são clivadas por esterases e oxidadas por ROS e ONOO⁻ respectivamente, a compostos fluorescentes detectáveis a 485 nm de emissão e 530 nm de excitação. A leitura foi feita em fluorímetro e os dados expressos como média \pm EP do aumento da média de intensidade de fluorescência sobre o grupo não infectado.

3.14. PCR em tempo real de genes murinos

Para quantificação dos níveis de expressão de gp91^{phox}, NOS2 e IFN- α/β , baços foram removidos no 3º, 5º e 7º dias após a infecção e o RNA total foi extraído utilizando kit Qiagen RNeasy. O RNA obtido foi ressuspenso em água tratada contendo dietil-pirocarbonato e estocado a -70°C até o uso. Após, uma reação utilizando transcriptase reversa M-MLV (Promega) e 2µg de RNA. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um volume total de 10 µl em uma placa de 96 poços (Applied Biosystems™) contendo 5µl de Power SYBR Green PCR Master Mix, 2,5ng dos primers senso e do antisenso. O PCR em tempo real foi realizado no aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), usando o programa padrão do sistema para SYBR green: 10 minutos para pre-incubação a 95°C seguido de 40 ciclos (15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C). Ao fim de cada reação, o *cycle*

threshold (Ct) foi utilizado no nível que correspondia ao melhor parâmetro cinético do PCR e as curvas de *melting* foram obtidas e analisadas. Os níveis relativos de expressão gênica foram determinados pelo método comparativo limiar do ciclo como descrito pelo fabricante, em que dados de cada amostra foram normalizados pelo RNA ribossomal do gene 18S e expressos como proporção de vezes em comparação ao grupo controle não infectado. Os seguintes pares de primers foram utilizados: 18S ribosomal RNA, 5'-CGTTCCACCAACTAAGAACG-3' (forward) e 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3' (reverse); IFN- β , 5' - GCTGGTGAAGAAATTAGCATTTCAG-3'(forward) e 3'-CGTCATCTCCATAGGGATCTTGA-5'(reverse); NOS2, 5'-AGCACTTTGGGTGACCACCAGGA-3' (forward) e 5'-AGCTAAGTATTAGAGCGGCGGCA -3' (reverse); gp91^{phox} 5'-TCCTATGTTCTGTACCTTTGTG-3' (forward) e 5'-CCCACCTCCATCTTGAATCC-3'(reverse).

3.15. Avaliação dos níveis das Transaminases Hepáticas no soro

O sangue dos animais foi retirado pela veia cava inferior, colocado em tubos heparinizados, centrifugados 5.000 RPM por 10 minutos para obtenção do soro. A dosagem das transaminases hepáticas foi realizada através de teste colorimétrico utilizando Kits específicos para cada uma, conforme instruções do fabricante. A transaminase TGO/AST dosada pelo Kit K034 e a transaminase TGP/ ALT pelo Kit K035, ambos da Bioclin/Quibasa. A leitura foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 505 nm.

3.16. Avaliação histopatológica

Em dias pré-determinados após a infecção, os animais foram sacrificados e o fígado de cada um coletado. Estes foram imersos em formol tamponado a 10% em PBS

por 18 horas e em seguida, colocados em solução de álcool 70% até o processamento das amostras. Para o processamento, os tecidos foram submetidos a subseqüentes passagens em etanol em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 minutos cada) e em parafina líquida (Paraplast Sigma; 1 e 2 – 30 minutos). Esses tecidos foram incluídos em blocos de parafina. Cortes de 5 micrótomos (μm) de espessura foram dispostos em lâminas de microscopia. Após essa fase, foram desparafinizados (xilol 20 minutos; álcool absoluto, 90%, 80% e 70% - 5 imersões; água). As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de Hematoxilina de Harris (20 segundos) e Eosina (8 segundos) (HE). Em seguida, houve a desidratação (álcool 70, 80, 90% e absoluto 1 e 2 – 5 imersões; xilol 1 e 2 – 5 imersões) e montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá sintético.

A Pontuação histopatologia foi realizada de acordo com um conjunto de critérios personalizados (modificado de PAES *et al.*, 2009), em que se avaliou necrose e hemorragia, adicionado a uma escala de cinco pontos (0-ausente, 1-mínimo, 2-leve, 3-moderado, 4-acentuado, 5-grave). Duas seções para cada animal foram examinadas e os resultados foram representados como valores de dano em cada camundongo.

3.17. Titulação do vírus da Dengue

Células LLC- MK2 foram crescidas em meio DMEM com 5 a 6% de soro fetal bovino (SFB) na presença dos antibióticos: fungizona (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina (100 U/mL) e gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em seguida tripsinizadas, homogeneizadas e implantadas em placa de seis poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C por cerca de 24 horas, quando então seus poços apresentaram uma monocamada de células com uma confluência de 70% a 80%. As amostras de baço foram pesadas, maceradas com “cadinho” e pistilo de porcelana

estéreis e diluídas serialmente em meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB. As amostras de sangue foram diluídas em PBS e diluídas serialmente em DMEM. A cada poço de uma placa foi adicionado 400 µL de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-7}) de uma dada amostra. O controle de células correspondeu a um poço não-inoculado, ao qual foi acrescentado apenas o meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB. As placas foram incubadas por um período de uma hora e meia a 37°C (período de adsorção) durante o qual foram gentilmente movimentadas de quinze em quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Terminado o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato (“*phosphate-buffered saline* – PBS”) (0.4 M NaCl e 10 mM de NaPO₄). Em seguida, foi adicionado meio 199 contendo 1.5% de carboximetilcelulose, antibióticos e 3% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C por 7 dias ou até que aparecessem os efeitos citopáticos observados ao microscópio invertido. As mesmas foram fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em PBS para a determinação do título das amostras, os quais foram expressos em PFU/mL (unidades formadoras de placas por mililitro).

3.18. Imuno-histoquímica e quantificação de células NS3+

Para avaliar o perfil de infecção pelo DENV-3 no fígado dos animais, estes foram sacrificados no sétimo dia após a infecção, tendo o fígado removido e fixado em solução 10% formol em PBS, pH 7.4. Após o tempo mínimo de fixação por 48 horas, os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização em xilol, banho e inclusão em parafina. Cortes longitudinais foram montados em lâminas gelatinizadas (2 cortes/lâminas). As lâminas foram cobertas com 2% de “3-aminopropyltriethylsilane”

(Sigma - Aldrich, St. Louis, MO), desparafinizadas, e imersas em xilol, em seguida, álcool e posteriormente incubadas com 3% de peróxido de hidrogênio diluído em Tris-buffered salina (TBS) (pH 7.4) por 40 minutos. Em seguida, os tecidos foram imersos em solução de citrato “buffer citrate” (pH 6.0; Sigma, P4809) durante 20 min. à 95°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com 3% albumina bovina (BSA) diluídos em água destilada, em temperatura ambiente, por 20 minutos. Os tecidos foram então, incubados com anticorpo primário: anticorpo policlonal de murino DENV NS3 E1D8 em uma diluição de 1:350 a 4°C “overnight” na câmara umidificadora. Controles foram feitos com anticorpo policlonal anti-IgG. Após lavagem em TBS, as lâminas foram cobertas com streptavidina-biotina (LSAB kit, K0492, Dako, Carpinteria, CA). Em seguida imcubadas em 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) em solução cromógena (K3468, Dako) por 2 à 5 minutos na temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram coradas com Hematoxilina de Mayer e analisadas em microscópio óptico. Controles negativos obtidos pela substituição do anticorpo primário por 1% de PBS-BSA.

Para quantificação de células NS3+, a contagem celular foi realizada em 10 campos alternados do microscópio (x400) para cada amostra (4 a 5 animais por grupo).

3.19. Ensaio de vírus

Células LLC-MK2 foram crescidas em meio DMEM com 5% de SFB, sendo implantadas em placa de seis poços a uma densidade de 2×10^5 células/poço. Após 24 h, as monocamadas recém-fechadas foram infectadas com MOI de 0,1 vírus, sendo que o controle utilizado correspondeu a um poço com células não infectadas. Em seguida, foi adicionado meio DMEM, com 5% de SFB, contendo SIN-1, NPS ou H₂O₂ em concentrações crescentes, iniciando-se em 0,1 mM até 3mM (SIN-1 ou NPS) ou

0,0001% até 0,1%, (H₂O₂). Após 48h, o sobrenadante foi coletado e titulado conforme item 4.3.

3.20. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão médio (EPM). Alguns resultados foram apresentados como mediana, estes estão especificados nas respectivas legendas das figuras. As proporções de aumento ou inibição foram calculadas através da subtração dos níveis de basais (obtidos em animais não-infectados) em relação aos animais controle e/ou tratados. As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls. Quando necessário foi utilizado o teste t de student. Diferenças entre as curvas de sobrevivência foram calculadas usando o teste *Log rank*. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM 5.0, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA). Resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. *RESULTADOS*

4.1. Análise de IL-1 β , PTX-3, sTNFR1 e sTNFR2 no soro de pacientes com dengue

Nosso primeiro passo neste trabalho foi avaliar o perfil inflamatório sistêmico durante a dengue, além de possíveis marcadores moleculares que poderiam estar associados à evolução da doença em humanos. Os níveis séricos de IL-1 β , PTX-3, sTNFR1 e sTNFR2 foram avaliados em pacientes que procuraram atendimento em uma unidade básica de saúde em Belo Horizonte durante o período epidêmico de 2010 (Janeiro a Março). Amostras de indivíduos saudáveis foram utilizadas como controle negativo. Os dados foram agrupados em fase precoce (amostras de pacientes cujo primeiro atendimento ocorreu nos primeiros três dias de sintomas de febre) e fase tardia (amostras de pacientes cujo primeiro atendimento ocorreu após três dias até sete dias de sintomas de febre).

Não houve correlação entre a produção de IL-1 β ou PTX-3 e os dias de sintomas de febre relatados pelos pacientes independentemente da origem da febre, uma vez que apesar de terem sido observados plaquetopenia ou maiores valores de hematócrito (dados não mostrados) em alguns pacientes, não houve diferença entre a produção de IL-1 β ou PTX-3 entre pacientes saudáveis, com diagnóstico de dengue confirmado e pacientes febris de origem inespecífica (FIGURAS 1a-b).

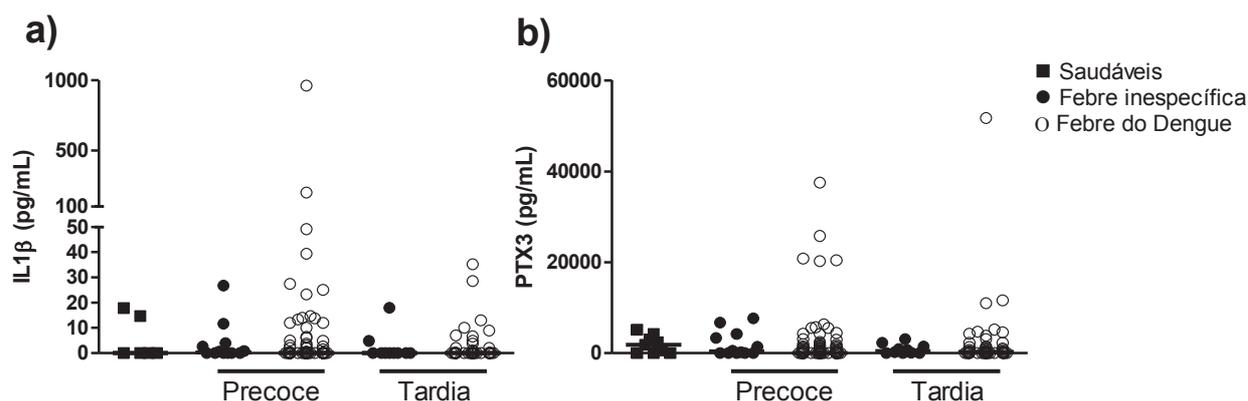


FIGURA 1. IL-1 β e PTX-3 não são significativamente detectados na dengue clássica. (a) Níveis de IL-1 β no soro de pacientes saudáveis e de pacientes febris na fase de doença precoce e tardia. (b) Níveis de PTX3 no soro de pacientes saudáveis e de pacientes febris na fase de doença precoce e tardia. As amostras de pacientes febris foram colhidas no dia em que esses pacientes procuraram atendimento médico após o início dos sintomas. Amostras de indivíduos saudáveis foram colidas em voluntários desejosos em participar do estudo. Os resultados foram obtidos por ELISA e as linhas representam a mediana da amostragem de cada grupo individualmente. Os indivíduos foram agrupados da seguinte maneira: Indivíduos saudáveis, n=9. Fase precoce: n=12 pacientes febris de origem inespecífica e n=106 pacientes com dengue. Fase tardia: n=11 pacientes febris de origem inespecífica e n=50 pacientes com dengue.

Por outro lado, houve maior detecção de sTNFR1 e sTNFR2 no soro de pacientes com dengue em ambas as fases da doença em relação ao grupo de indivíduos saudáveis. Similarmente, o mesmo resultado foi visto em pacientes febris de origem inespecífica. Porém, o grupo de pacientes com dengue na fase tardia apresentou níveis maiores de sTNFR2 no soro em relação ao grupo de pacientes febris de origem inespecífica com os mesmo dias de sintomas. Dessa forma, apesar do aumento de sTNFR1 não se restringir a febre do dengue, a detecção de sTNFR2 se mostrou útil como marcador de fase tardia da dengue clássica em relação a outros processos febris de origem multifatorial (FIGURAS 2a-b).

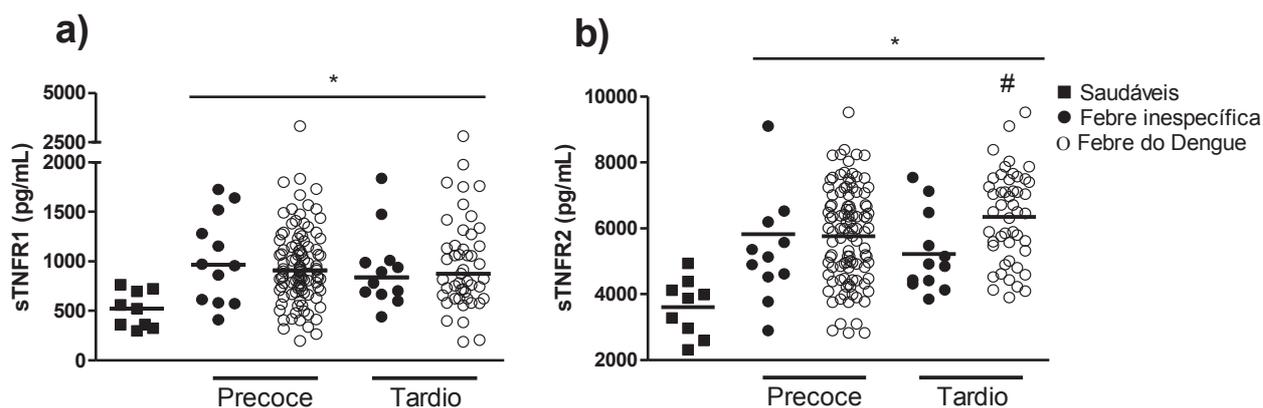


FIGURA 2. Receptores solúveis de TNF são expressos no soro de pacientes febris: sTNFR-2 correlaciona-se à fase tardia da dengue. (a), Níveis de sTNFR-1 no soro de pacientes saudáveis e de pacientes febris na fase de doença precoce e tardia. (b) Níveis sTNFR-2 no soro de pacientes saudáveis e de pacientes febris na fase de doença precoce e tardia. As amostras de pacientes febris foram colhidas no dia em que esses pacientes procuraram atendimento médico após o início dos sintomas. Amostras de indivíduos saudáveis foram colidas em voluntários desejosos em participar do estudo. Os resultados foram obtidos por ELISA e as linhas representam a média da amostragem de cada grupo individualmente. Indivíduos saudáveis, n=9. Fase precoce: n=12 pacientes febris de origem inespecífica e n=106 pacientes com dengue. Fase tardia: n=11 pacientes febris de origem inespecífica e n=50 pacientes com dengue. * $p < 0,05$ em relação ao grupo de indivíduos saudáveis. # $p < 0,05$ em relação ao grupo de pacientes com sintomas de febre inespecífica na mesma fase.

4.2. Análise de TNF- α , IL6, IL4, IL-10 e IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com dengue estimuladas com antígeno (proteína E)

Para avaliar a ativação celular induzida por antígeno viral, a produção de TNF- α , IL6, IL4, IL-10 e IFN- γ foi mensurada em PBMCs isolados de pacientes com dengue, independentemente dos dias de sintomas, e de indivíduos saudáveis na presença ou ausência de Proteína E viral. A presença da Proteína E viral induziu aumento significativo das concentrações de IL-6 e TNF- α (FIGURAS 3a-b) em pacientes previamente diagnosticados com dengue em comparação a pacientes saudáveis (dados

não mostrados). Não foram observadas diferenças nos níveis de IL-4 e IL-10 na presença do mesmo antígeno (FIGURAS 3c-d). Os níveis de IFN- γ foram indetectáveis em todos os ensaios (dados não mostrados).

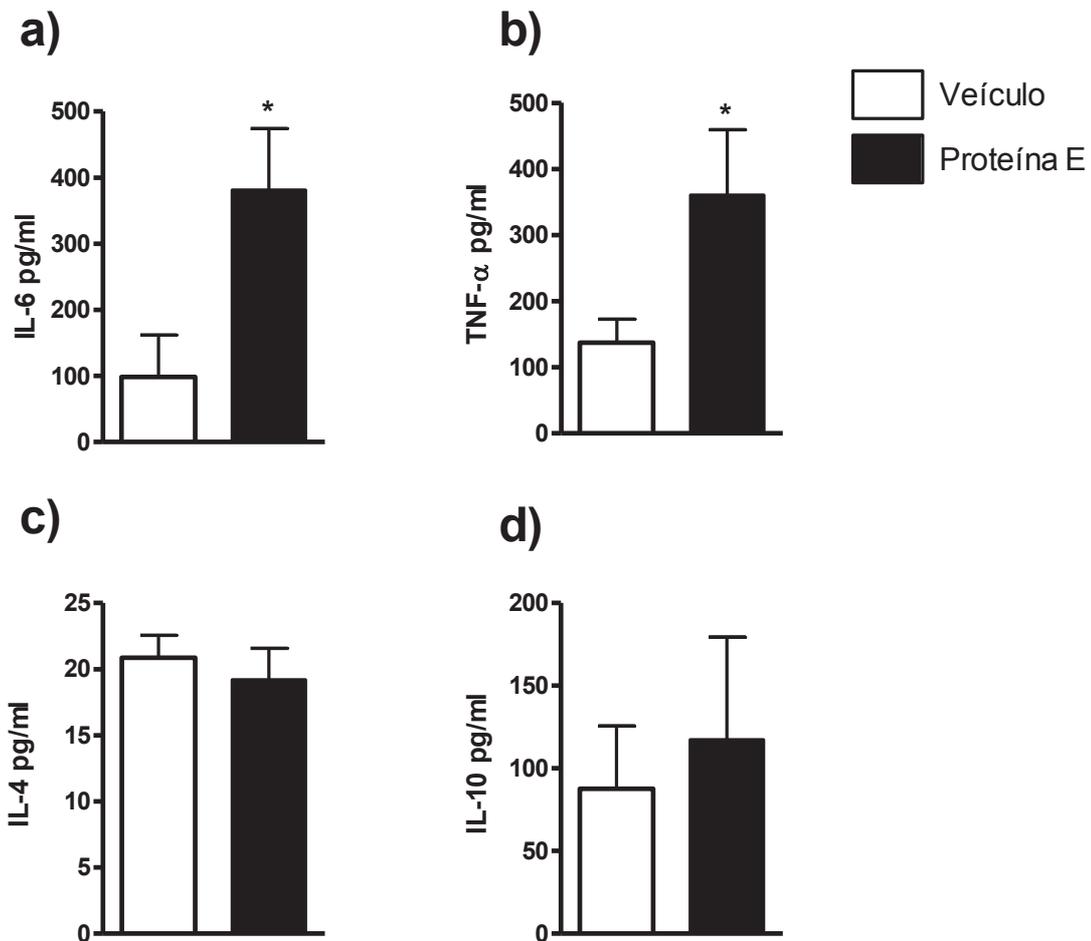


FIGURA 3. Proteína E viral induz a produção de IL-6 e TNF- α em PBMC isolados de pacientes com dengue clássica. Células mononucleares periféricas do sangue (PBMC) foram isoladas de pacientes com dengue e estimuladas na presença de proteína E de dengue (0,3 μ g/mL). (a), Níveis de IL-6, (b) níveis de TNF- α , (c) níveis de IL-4, (d) níveis de IL-10 detectados no sobrenadante da cultura celular após 48h. Os resultados foram obtidos por ELISA. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. n=12 pacientes agrupados conforme diagnóstico prévio de dengue, independentemente dos dias de sintomas. *p<0,05 em relação ao grupo estimulado com veículo.

4.3. Análise da concentração de DNA mitocondrial livre no soro como marcador da progressão da dengue em humanos

Resultados prévios sugerem que a instalação de um processo inflamatório sistêmico induz índices elevados de apoptose e necrose e isso poderia desempenhar um papel na progressão e gravidade da dengue (ZHANG *et al.*, 2010). Nesse contexto, avaliamos o perfil de liberação de DNA mitocondrial no soro dos pacientes e a possível correlação com a progressão e gravidade da doença.

Pacientes que tiveram dengue confirmada apresentaram níveis maiores de DNA mitocondrial livre no 7º dia de sintomas da doença (FIGURA 4a), indicando que neste período há maior lesão tecidual e lise celular. A FIGURA 4b mostra de forma mais agrupada as concentrações de DNA mitocondrial em pacientes febris de origem inespecífica e com dengue confirmada independentemente dos dias de sintomas. Ambos os grupos apresentaram aumento nos níveis de DNA mitocondrial em relação ao grupo de indivíduos saudáveis.

Semelhantemente ao que foi visto durante a dengue em humanos, a infecção por DENV-3 em camundongos induziu maior liberação de DNA mitocondrial no soro. Conforme a FIGURA 4c, houve aumento de aproximadamente cem vezes na concentração de DNA mitocondrial livre no soro já no 5º dia após a infecção em relação ao grupo controle não infectado, valores que se mantiveram aumentados no 7º dia de infecção.

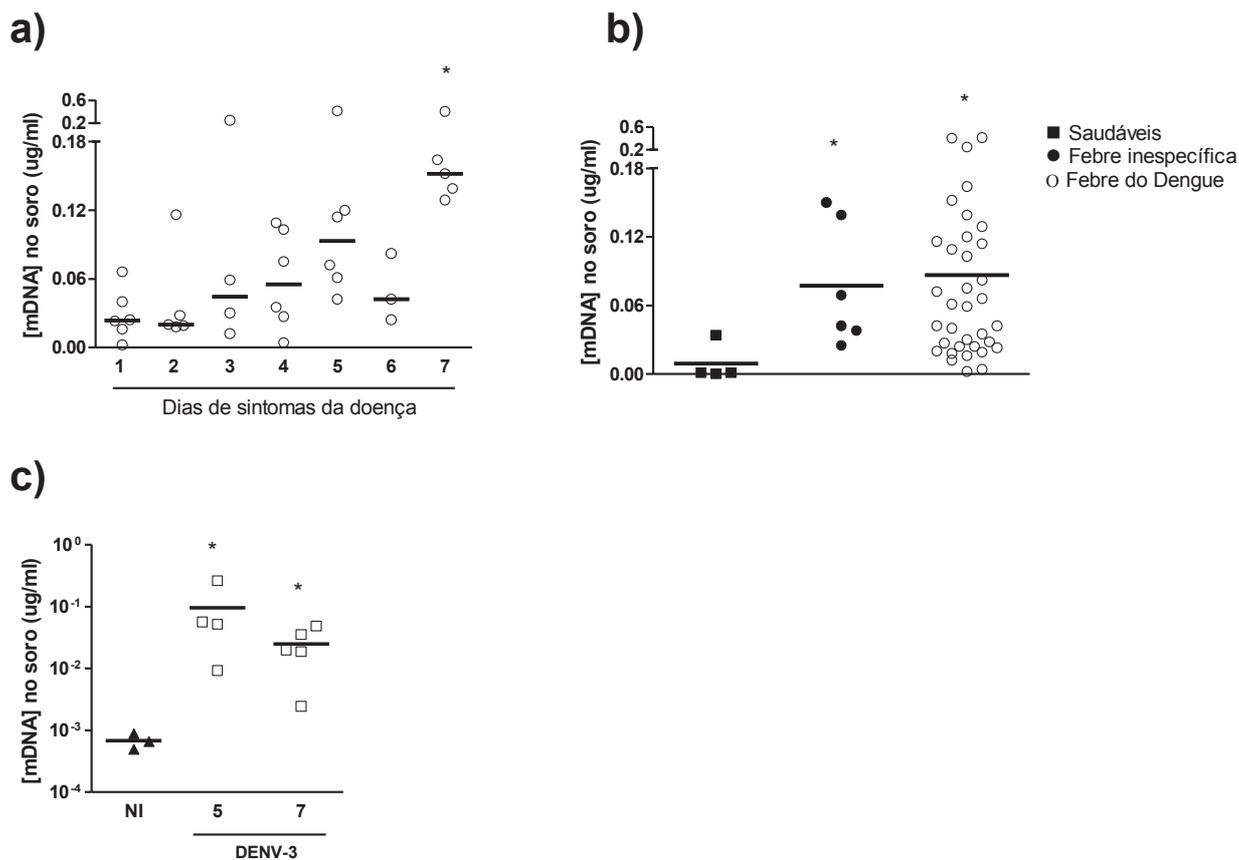


FIGURA 4. Níveis de DNA mitocondrial livre no soro são aumentados em pacientes febris e animais infectados com DENV-3. (a) níveis de DNA mitocondrial livre em pacientes diagnosticados com febre do Dengue estratificados por dias de sintomas da doença. (b), níveis de DNA mitocondrial no soro de pacientes saudáveis e de pacientes febris na fase de doença precoce e tardia. (c), níveis de DNA mitocondrial livre no soro de camundongos não infectados ou infectados com DENV-3 (100 PFU i. p) e eutanasiados nos tempos indicados. As amostras de pacientes febris foram colhidas no dia em que esses pacientes procuraram atendimento médico após o início dos sintomas. Amostras de indivíduos saudáveis foram colidas em voluntários desejosos em participar do estudo. Em (a-b), os resultados foram expressos como mediana. n=4 indivíduos saudáveis, n=6 pacientes febris de origem inespecífica e n=35 pacientes com dengue. Em (c), os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. n=5 animais por grupo. *, p<0,05 em relação ao grupo de indivíduos saudáveis. #, p<0,05 em relação ao grupo de animais não infectados.

4.4. Participação de produtos originados de lesão celular na ativação de TLR9 durante a infecção por DENV-3

Produtos originados de lesão celular como DNA mitocondrial podem ser reconhecidos por TLR9 ativando diversos fatores de transcrição nuclear como IRF-3 ou NF- κ B, culminando em último estado na indução de IFN-I e citocinas inflamatórias (DAVIS *et al.*, 2006; KENNY & O'NEILL, 2008; KAWAII & AKIRA, 2011). Para estudar a participação dessa via durante a dengue experimental, camundongos selvagens e TLR9^{-/-} foram infectados com inóculo subletal de DENV-3 e sacrificados após sete dias.

O inóculo utilizado não gerou alterações nos níveis de hematócrito no grupo selvagem infectado. Esses animais apresentaram apenas plaquetopenia leve após a infecção. Entretanto, na ausência de TLR9 a doença se manifestou de forma grave com aumento dos níveis de hematócrito e plaquetopenia acentuada (FIGURAS 5a-b). Em relação ao acúmulo de neutrófilos, não foram observadas diferenças entre os grupos de animais selvagens infectados e não infectados quanto à atividade da MPO no baço. Porém, verificamos aumento significativo da atividade dessa enzima no fígado na ausência de TLR9 em relação a todos os outros grupos avaliados (FIGURA 5c).

Além disso, houve lesão hepática em todos os grupos avaliados após a infecção pelo DENV-3, o que foi demonstrado pelo aumento da atividade de transaminases hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro dos animais. Entretanto, os valores de AST foram ainda maiores no grupo de animais TLR9^{-/-}, o que foi estatisticamente diferente de todos os outros grupos avaliados (FIGURA 5d). Corroborando, a histologia do fígado em animais TLR9^{-/-} evidenciou necroses disseminadas por todo o órgão, lesões características de uma infecção grave

pelo vírus da dengue. Intensas áreas de hemorragia foram observadas no fígado desses animais. Nas áreas de necrose e seus arredores há vacuolização, cariólise e uma desorganização completa da estrutura dos hepatócitos. Animais do grupo TLR9^{-/-} pontuaram mais necrose e hemorragia no fígado em comparação aos animais do grupo selvagem infectado (FIGURA 5e). Além disso, verificamos que a ausência de TLR9 interferiu diretamente no balanço resistência do hospedeiro à infecção/controla da carga viral, uma vez que animais TLR9^{-/-} apresentaram mais hepatócitos NS3⁺ no fígado em relação ao grupo selvagem infectado (FIGURA 5f).

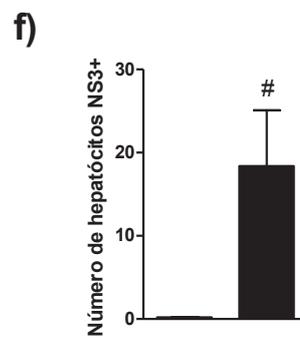
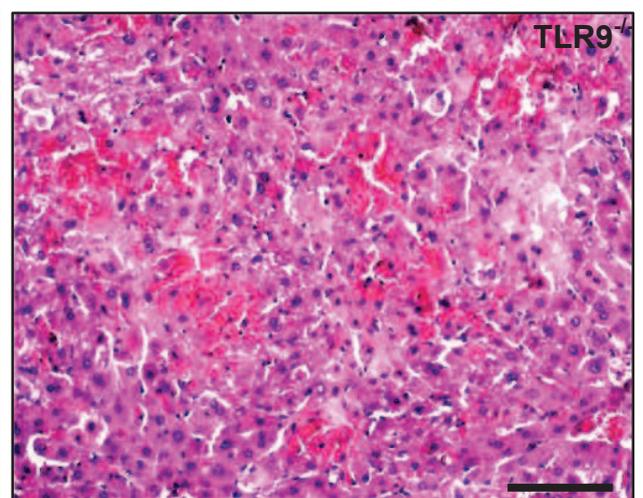
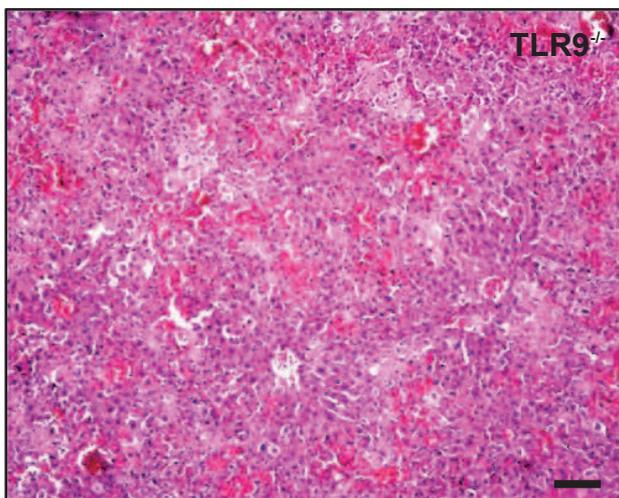
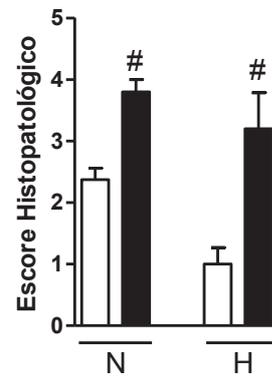
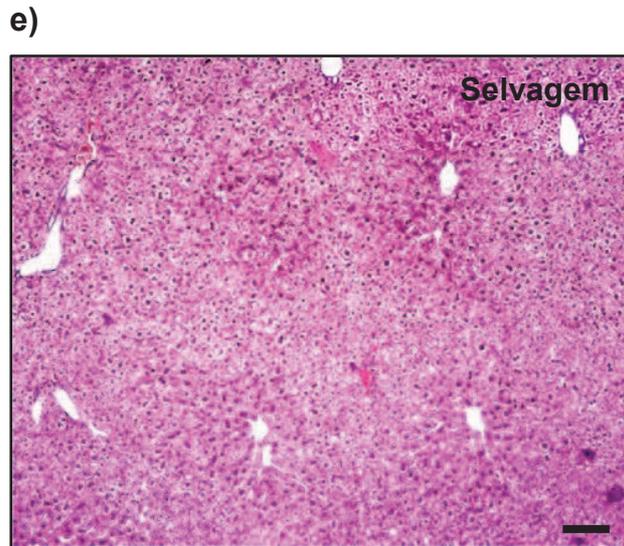
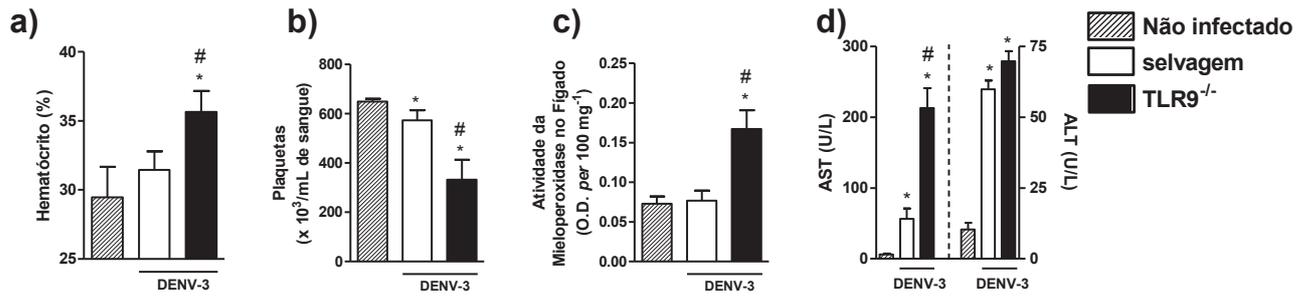


FIGURA 5. A ausência de TLR9 resulta em manifestação da doença mais grave após a infecção pelo DENV-3. Camundongos selvagens ou deficientes em TLR9 foram infectados com 10PFU de DENV-3, i. p. e eutanasiados após sete dias para análise dos seguintes parâmetros: (a), níveis de hematócrito; (b), contagem de plaquetas no sangue; (c), acúmulo de neutrófilos no fígado, inferido pela atividade de MPO em valores de densidade óptica (O. D.); (d), atividade das transaminases hepáticas AST (painel esquerdo) e ALT (painel direito) no soro; (e), lesão hepática avaliada pela análise semi-quantitativa de necrose (N) e hemorragia (H) hepática (modificada de PAES *et al.*, 2009) e coloração por Hematoxilina e Eosina de cortes histológicos do fígado. As barras de escala equivalem a 100 μ m. As imagens apresentadas são representativas de um animal de cada grupo; (f), Número de hepatócitos marcados com anticorpo de dengue NS3 E1D8 (NS3). Os resultados expressam a média da contagem de células NS3⁺ de 10 campos aleatórios utilizando aumento de 400X. Os demais resultados foram expressos como média \pm erro padrão e são representativos de pelo menos três experimentos independentes. n=5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo não infectado; #p<0,05 em relação ao grupo selvagem infectado.

Esses dados foram seguidos por aumento na concentração de TNF- α no baço e no fígado em animais selvagens após a infecção com DENV-3 em relação ao grupo controle não infectado, entretanto, não houve alteração na concentração de TNF- α no grupo TLR9^{-/-} infectado com DENV-3 em relação ao grupo selvagem infectado. (FIGURA 6a-b).

Nosso próximo passo foi avaliar os níveis de IL-1 β e IFN- γ em órgãos alvo da infecção pelo vírus da dengue. Essas citocinas já foram previamente descritas pelo nosso grupo como cruciais a resistência do hospedeiro a infecção durante a dengue experimental (FAGUNDES *et al.*, 2011, COSTA *et al.*, 2012). Após a infecção, houve aumento na detecção de IL-1 β no baço e no fígado em animais selvagens. Por outro lado, a ausência de TLR9 interferiu na capacidade dos animais em induzir IL-1 β em resposta à infecção pelo DENV-3 nesses órgãos (FIGURA 6c-d). De maneira semelhante, verificamos aumento na detecção de IFN- γ no baço e no fígado de animais selvagens após a infecção. Contudo, em animais TLR9^{-/-} a produção de IFN- γ induzida

por DENV-3 foi reduzida (FIGURA 6e-f). Ainda, a infecção pelo DENV-3 induziu aumento do transcrito de IFN- β no baço. Entretanto, a ausência de TLR9 prejudicou a eficiência na indução de transcrito de IFN- β nesse órgão (FIGURA 6g).

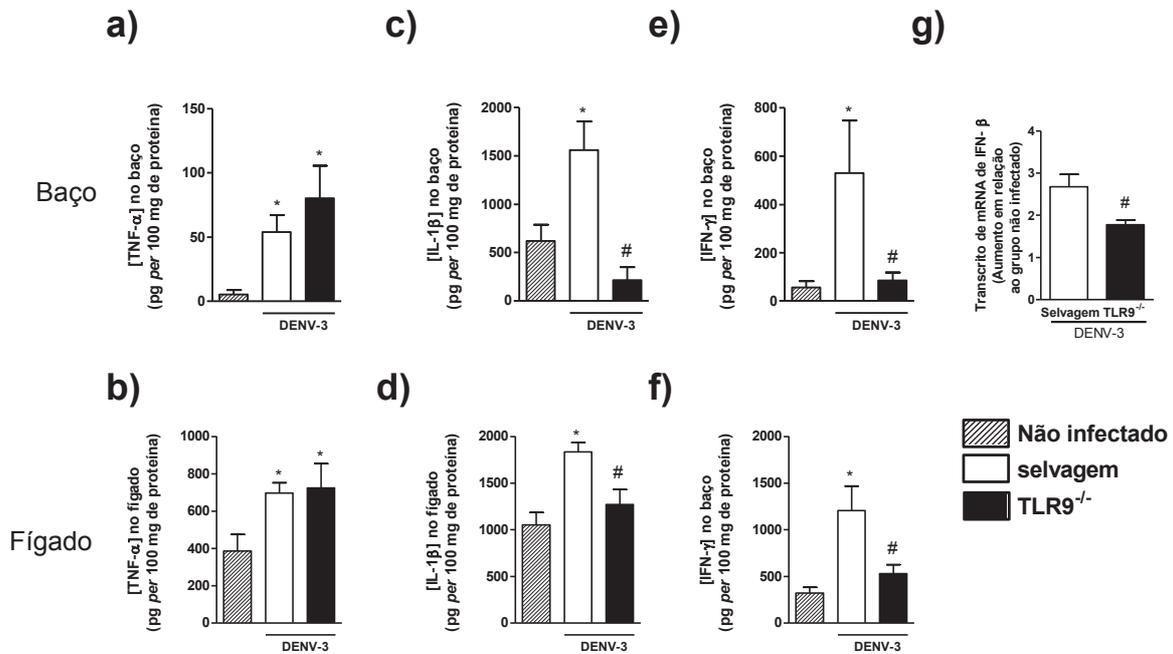


FIGURA 6. A produção de IL-1 β e IFNs são comprometidas na ausência de TLR9 durante a dengue experimental. Camundongos selvagens ou deficientes em TLR9 foram infectados com 10PFU de DENV-3, i. p. e eutanasiados após sete dias para análise dos seguintes parâmetros: (a-b), níveis de TNF- α ; (c-d), IL-1 β ; e (e-f), IFN- γ detectados por ELISA no baço e fígado; e (g), mRNA transcrito de IFN- β avaliado por qPCR no baço. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (exceto em g, expresso como vezes de aumento sobre a expressão basal do grupo não infectado) e são representativos de pelo menos três experimentos independentes. n=5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo não infectado; #p<0,05 em relação ao grupo selvagem infectado.

Esses resultados demonstram que IL-1 β , IFN- β e IFN- γ são regulados pela ativação de TLR9 durante a dengue experimental. Na ausência de TLR9 os animais manifestam a doença mais grave e são incapazes de controlar com eficiência a

replicação viral, confirmando a participação dessas citocinas e desse receptor na resistência do hospedeiro durante a dengue experimental.

4.5. Geração de ROS e indução da expressão de gp91^{phox} durante a infecção pelo DENV-3

Nos últimos anos, nosso grupo tem trabalhado extensamente no entendimento da participação de IFN- γ durante a infecção pelo vírus da dengue. Sabe-se que IFN- γ é capaz de induzir a expressão de NOS2 e gp91^{phox} com consequente produção de NO e O₂⁻ em vários processos. Entretanto, o papel do complexo NADPH-oxidase e da produção de O₂⁻ durante a dengue experimental ainda eram desconhecidos. Assim, nosso próximo passo foi verificar se esse complexo e a geração do O₂⁻ desempenhariam algum papel na progressão ou controle da doença durante a infecção pelo DENV-3.

Inicialmente, foram realizados alguns experimentos em animais selvagens para avaliar a cinética de produção de ROS e os níveis de expressão de transcrito de gp91^{phox} durante a dengue experimental. Após o 5º e 7º dias de infecção, houve aumento significativo da geração de ROS em esplenócitos isolados de animais selvagens em relação ao grupo controle não infetado. (FIGURA 7a). Esses resultados foram acompanhados por aumento dos níveis de transcrito de gp91^{phox} no baço nos mesmos tempos estudados. (FIGURA 7b). Por outro lado, o tratamento com Apocinina ou a ausência da proteína gp91^{phox}^{-/-} levou ao prejuízo na geração de ROS após a infecção. Esses dados confirmam o complexo NADPH-oxidase como um importante gerador de ROS durante a dengue experimental, uma vez que a média de intensidade de fluorescência de DCF-DA no grupo de animais tratados com Apocinina ou gp91^{phox}^{-/-} foi menor do que a observada em todos os outros grupos experimentais após infecção (FIGURA 7c).

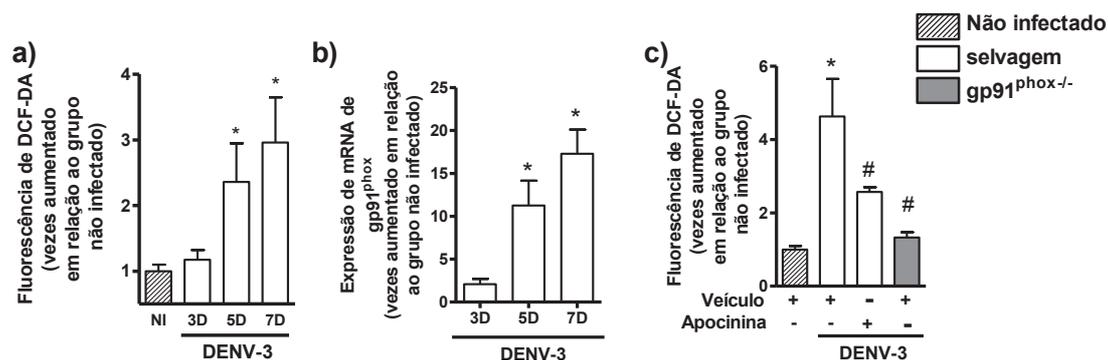


FIGURA 7. A expressão de gp91^{phox} e produção de ROS são aumentadas durante a dengue de maneira dependente de gp91^{phox}. Camundongos selvagens foram infectados com 100PFU de DENV-3, i. p. e eutanasiados nos tempos indicados para análise dos seguintes parâmetros: (a), produção de ROS por fluorimetria através da marcação de DCF-DA em esplenócitos isolados e (b), níveis de mRNA transcrito de gp91^{phox} no baço por qPCR. (c) Camundongos selvagens tratados com Apocinina ou veículo e camundongos deficientes em gp91^{phox} foram infectados com 100PFU de DENV-3, i. p., eutanasiados pós sete dias e esplenócitos foram isolados para análise da produção de ROS por fluorimetria através da marcação de DCF-DA. Os resultados foram expressos como vezes de aumento sobre a expressão basal do grupo não infectado e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. *p<0,05 em relação ao grupo não infectado; #p<0,05 em relação ao grupo selvagem infectado.

4.6. O complexo NADPH-Oxidase tem papel crucial durante a infecção pelo DENV-3

Para verificar o papel do complexo NADPH-Oxidase durante a dengue experimental, animais selvagens tratados com veículo ou Apocinina e animais gp91^{phox-/-} foram infectados com inóculo subletal de DENV-3 e a taxa de letalidade acompanhada durante 14 dias. Como visto na FIGURA 8a, animais selvagens tratados com Apocinina e gp91^{phox-/-} sucumbiram mais à infecção em relação ao grupo selvagem tratado com veículo, permanecendo vivos somente até o 10º dia de infecção, enquanto 80% dos animais selvagens tratados com veículo sobreviveram até o 14º dia de infecção.

Para análise das alterações hematológicas e inflamatórias, animais selvagens tratados com Apocinina ou animais $gp91^{phox-/-}$ foram infectados com inóculo subletal de DENV-3 e sacrificados após sete dias. Neste experimento, o inóculo utilizado gerou alterações hematológicas significativas com aumento nos níveis de hematócrito e plaquetopenia em todos os grupos avaliados. Porém, após o tratamento com Apocinina, valores ainda maiores de hematócrito e plaquetopenia mais acentuada foram observados após a infecção. Por outro lado, a deficiência da proteína $gp91^{phox-/-}$ não interferiu nos valores de hematócrito após a infecção nos animais. Porém foi observado plaquetopenia acentuada em animais $gp91^{phox-/-}$ em relação aos animais selvagens após a infecção (FIGURA 8b-c). Além disso, foi observado aumento significativo da atividade da enzima MPO no fígado do grupo selvagem após a infecção. Contudo, o tratamento com Apocinina ou a deficiência de $gp91^{phox}$ induziu aumento ainda maior na atividade dessa enzima no fígado após a infecção (FIGURA 8d).

Com relação ao perfil de citocinas, após infecção houve maior detecção de TNF- α no soro e no baço no grupo de animais selvagens em relação ao grupo controle não infectado. O tratamento com Apocinina não interferiu na produção de TNF- α em ambos os locais avaliados. Porém, a deficiência de $gp91^{phox}$ induziu valores mais altos de TNF- α tanto no soro quanto no baço em comparação a todos os outros grupos avaliados (FIGURA 8e). Ainda, houve maior detecção de IFN- γ no baço e soro de animais selvagens. Entretanto, o tratamento com Apocinina induziu maior produção IFN- γ em ambos os locais avaliados. Esses resultados foram estatisticamente diferentes de todos os outros grupos. Entretanto, a deficiência de $gp91^{phox}$ não interferiu na produção de IFN- γ após a infecção, uma vez que os valores dessa citocina no grupo de animais $gp91^{phox-/-}$ foram semelhantes aos valores observados no grupo de animais selvagens (FIGURA 8f).

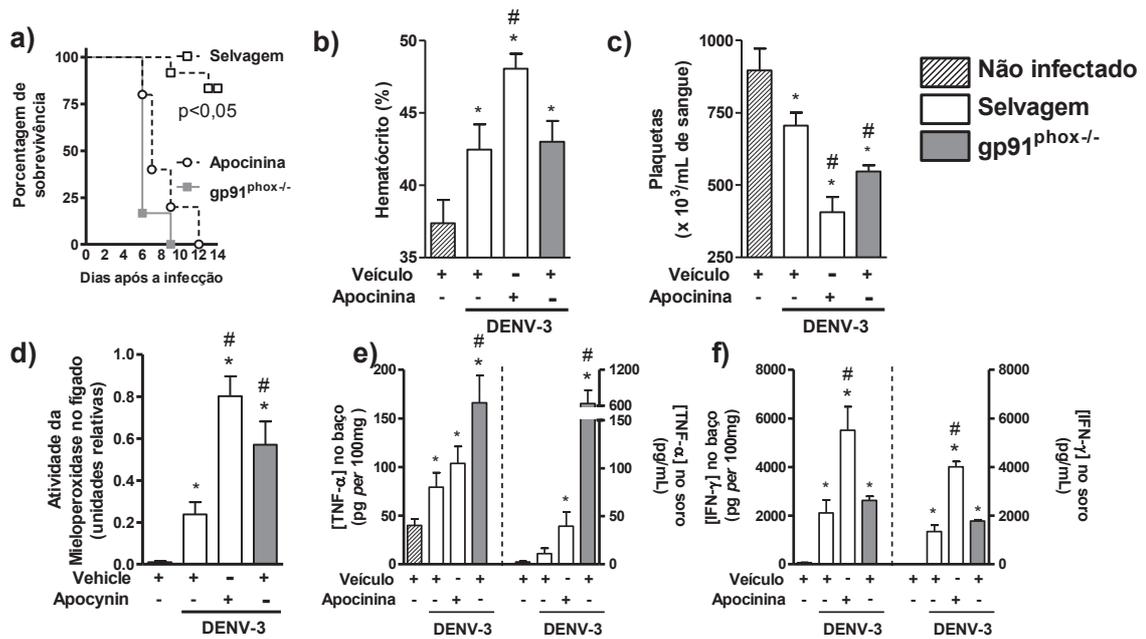


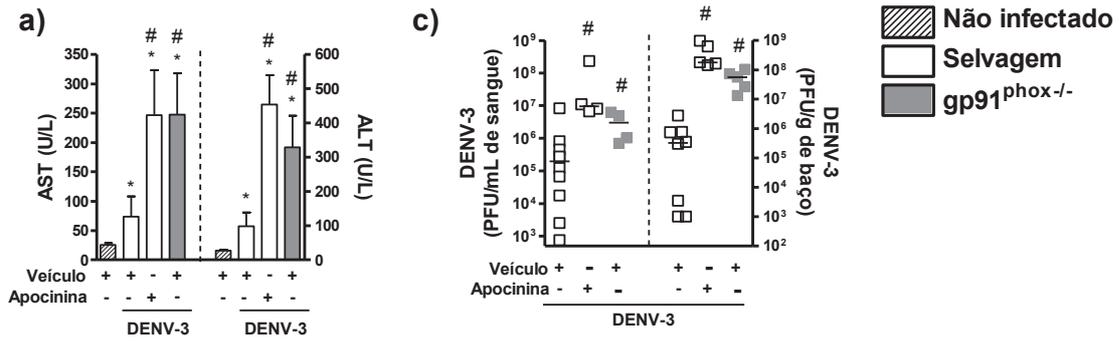
FIGURA 8. A inibição da formação do complexo NADPH-Oxidase resulta na manifestação da doença mais grave após a infecção pelo DENV-3. (a), camundongos selvagens tratados com veículo ou apocinina (20 mg.kg⁻¹) ou deficientes em gp91^{phox} (n=8) foram infectados com 100PFU de DENV-3, i. p. e as taxas de letalidade foram avaliadas diariamente durante 14 dias. Resultados foram expressos como % de sobrevivência. (b-f) Camundongos selvagens tratados com veículo ou apocinina (20 mg.kg⁻¹) ou deficientes em gp91^{phox} foram infectados com 100PFU de DENV-3, i. p. e eutanasiados após sete dias para análise dos seguintes parâmetros: (b), níveis de hematócrito; (c), contagem de plaquetas no sangue; (d), acúmulo de neutrófilos no fígado inferido pela atividade de MPO em unidades relativas e (e) níveis de TNF-α e (f) IFN-γ, detectados por ELISA no baço e soro. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão e são representativos de pelo menos três experimentos independentes. n=5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo não infectado; #p<0,05 em relação ao grupo selvagem infectado.

Ao analisarmos a lesão hepática, a infecção por DENV-3 induziu aumento nas atividades de AST e ALT no soro dos animais em relação ao grupo controle não infectado, inferindo maior lesão. Entretanto, o tratamento com Apocinina induziu a liberação ainda maior dessas transaminases no soro após a infecção. Esses resultados foram estatisticamente diferentes de todos os outros grupos avaliados. A deficiência de

gp91^{phox} não interferiu nas atividades de AST e ALT no soro após a infecção, porém esses valores permaneceram maiores em relação ao grupo não infectado (FIGURA 9a).

A histologia do fígado em animais selvagens tratados com Apocinina ou gp91^{phox/-} evidenciou intensas áreas de necrose disseminadas por todo o órgão. Além disso, é possível observar mais áreas de hemorragia e infiltrado celular no fígado desses animais quando comparados a animais selvagens infectados. As áreas de necrose e seus arredores apresentam de maneira intensa, vacuolização, cariólise e desorganização completa da estrutura dos hepatócitos. Além disso, animais selvagens tratados com Apocinina ou animais gp91^{phox/-} pontuaram mais necrose e hemorragia no fígado em comparação aos animais do grupo selvagem infectado (FIGURA 9b).

Por fim, verificamos que a inibição da formação do complexo NADPH-Oxidase pelo tratamento farmacológico com Apocinina ou pela ausência da proteína gp91^{phox} interferiu diretamente no balanço resistência do hospedeiro à infecção/controla da carga viral. Conforme a FIGURA 9c, animais selvagens tratados com Apocinina ou animais gp91^{phox/-} apresentaram maior carga viral no sangue e no baço em relação ao grupo selvagem infectado. Esses resultados confirmam a maior susceptibilidade a doença e a incapacidade dos animais em controlar com eficiência a replicação do DENV-3 durante a inibição do complexo NADPH-Oxidase.



b)

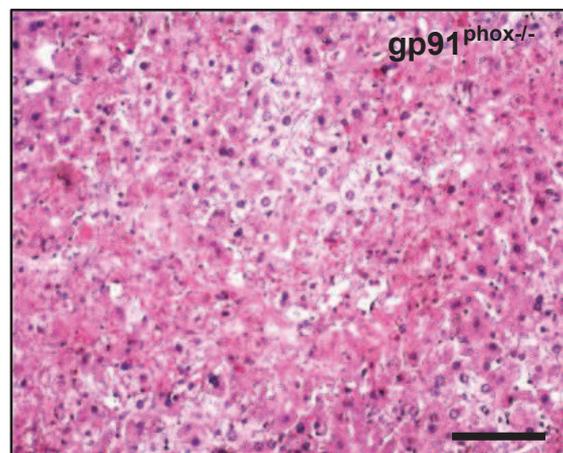
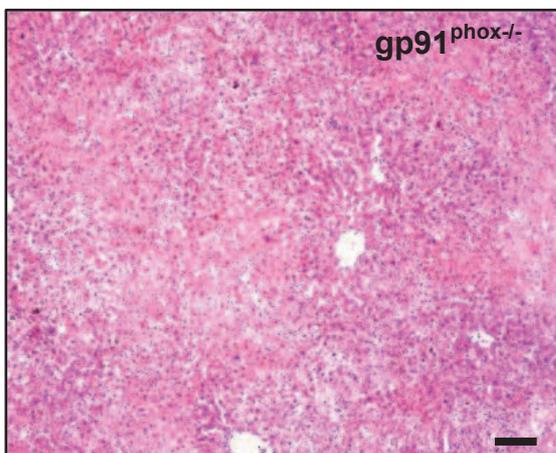
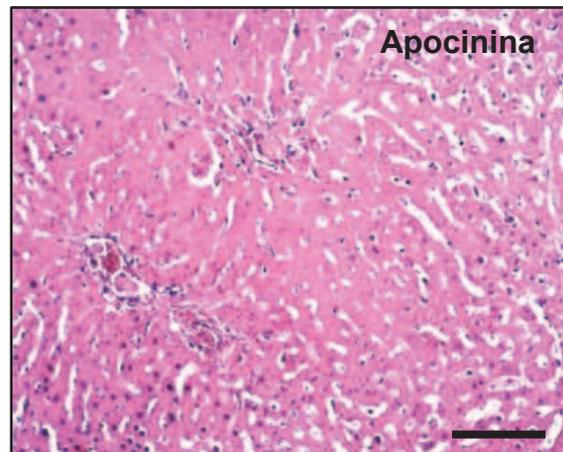
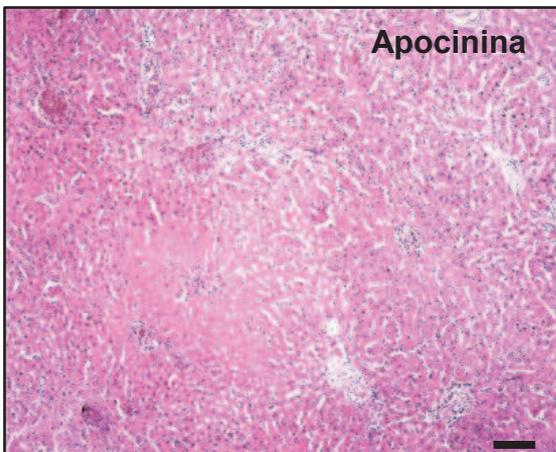
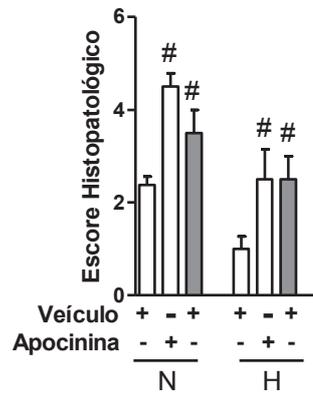
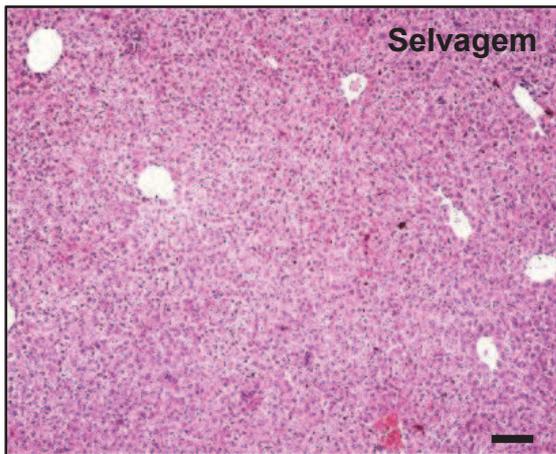


FIGURA 9. O desenvolvimento de doença grave em animais com comprometimento na produção de superóxido é seguido por maior lesão hepática e aumento da carga viral após a infecção pelo DENV-3. Camundongos selvagens tratados com veículo ou apocinina (20 mg.kg^{-1}) ou deficientes em $\text{gp91}^{\text{phox}}$ foram infectados com 100PFU de DENV-3, i. p e eutanasiados após sete dias para análise dos seguintes parâmetros: (a) atividade das transaminases hepáticas AST (painel esquerdo) e ALT (painel direito) no soro; (b) lesão hepática avaliada pela análise semi-quantitativa de necrose (N) e hemorragia (H) hepática (modificada de PAES *et al.*, 2009) e coloração por Hematoxilina e Eosina de cortes histológicos do fígado. As barras de escala equivalem a $100 \mu\text{m}$. As imagens apresentadas são representativas de um animal de cada grupo; (c) carga viral recuperada do sangue (painel esquerdo) e do baço (painel direito). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (exceto em (c) expresso por mediana) e são representativos de pelo menos três experimentos independentes. $n=5$ animais por grupo. * $p<0,05$ em relação ao grupo não infectado; # $p<0,05$ em relação ao grupo selvagem infectado.

4.7. Papel de IFN- γ na regulação de $\text{gp91}^{\text{phox}}$ e produção de espécies reativas durante a infecção pelo DENV-3.

Em nosso próximo passo, investigamos se IFN- γ poderia regular a expressão de $\text{gp91}^{\text{phox}}$ e a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ durante a dengue experimental. Para isso, animais selvagens e animais IFN- $\gamma^{-/-}$ foram infectados com DENV-3 e sacrificados cinco dias após a infecção. Esse tempo foi escolhido devido alta susceptibilidade e taxa de letalidade dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ ao vírus da dengue (FAGUNDES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012). A infecção com DENV-3 induziu aumento significativo na quantidade de transcrito de $\text{gp91}^{\text{phox}}$ no baço e na geração de ROS em esplenócitos isolados em animais selvagens. Porém, a ausência de IFN- γ comprometeu praticamente toda a indução de transcrito desse gene no baço (FIGURA 10a) e a geração de ROS em esplenócitos isolados após a infecção (FIGURA 10b). Esses dados demonstram que IFN- γ está envolvido na regulação de transcrição do gene que codifica $\text{gp91}^{\text{phox}}$ com consequente produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por NADPH-Oxidase durante a dengue experimental.

De maneira interessante, animais TLR9^{-/-} foram incapazes de induzir a produção de ROS após a infecção por DENV-3. Conforme a FIGURA 10c, esplenócitos isolados de animais selvagens tiveram aumento da produção de ROS de maneira tempo-dependente da infecção. Entretanto, esplenócitos isolados de animais TLR9^{-/-} foram incapazes de produzir ROS durante todos os períodos avaliados. Esses dados corroboram nossos achados iniciais, confirmando que a ativação de TLR9 também pode regular a produção do O₂⁻ por vias dependentes de IFN- γ .

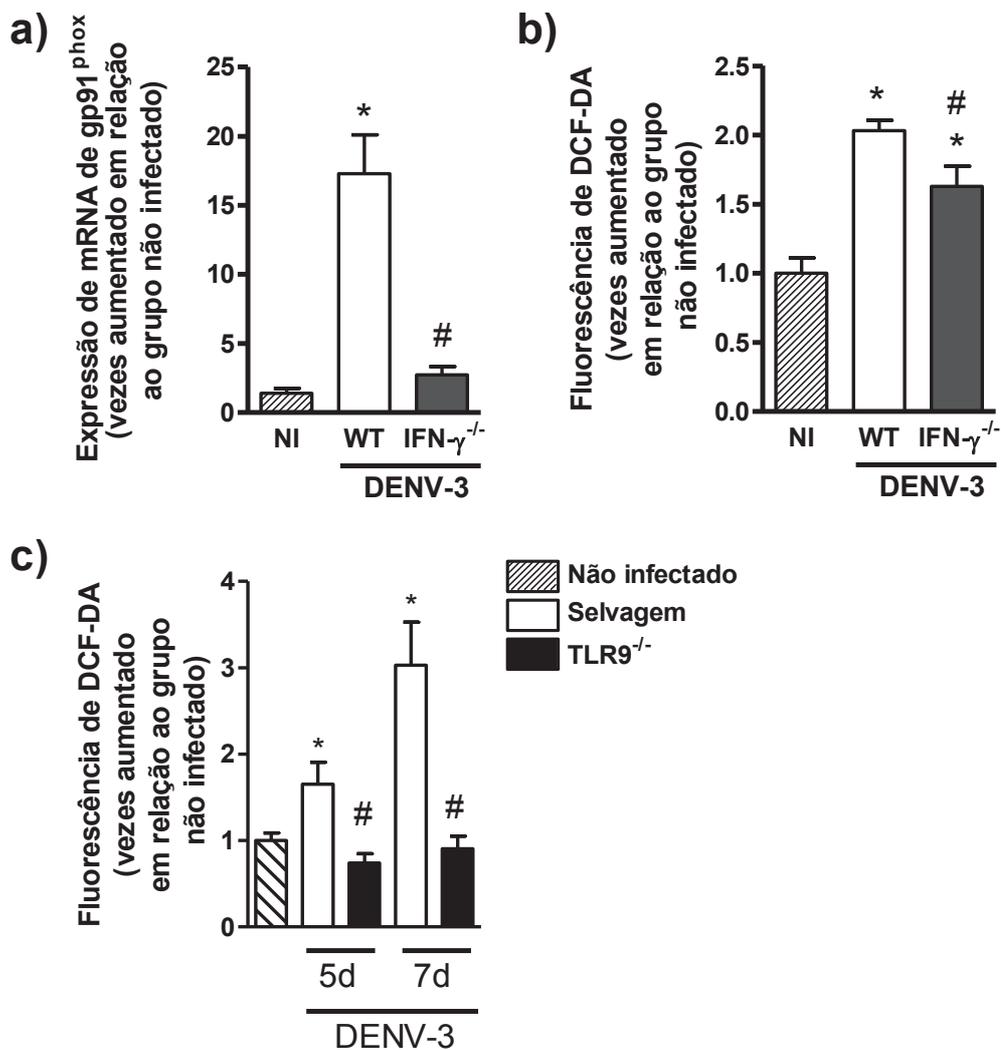


FIGURA 10. A expressão de gp91^{phox} e a produção de ROS são regulados positivamente por IFN- γ após a infecção pelo DENV-3. (a-b) Animais selvagens e deficientes em IFN- γ foram infectados com 100PFU de DENV-3 i.p. e eutanasiados após o quinto dia para análise dos seguintes parâmetros: (a), produção de ROS por fluorimetria através da marcação de DCF-DA em esplenócitos isolados. (b), níveis de mRNA transcrito de gp91^{phox} no baço por qPCR. (c) Camundongos selvagens e deficientes em TLR9 foram infectados com 100PFU de DENV-3, i. p., eutanasiados após o quinto dia e esplenócitos isolados para análise da produção de ROS por fluorimetria através da marcação de DCF-DA. Os resultados foram expressos como vezes de aumento sobre a expressão basal do grupo não infectado e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. *p<0,05 em relação ao grupo não infectado; #p<0,05 em relação ao grupo selvagem infectado.

4.8. Efeito cooperativo entre o ânion superóxido e o óxido nítrico na resistência do hospedeiro à infecção pelo DENV-3.

Nós demonstramos recentemente que IFN- γ é capaz de induzir a expressão de NOS2 durante a dengue experimental contribuindo para a produção de NO e do *clearance* viral (COSTA *et al.*, 2012), porém, nesse estudo animais NOS2^{-/-} sucumbiram à infecção tardiamente em relação a animais IFN- γ ^{-/-}, sendo que os últimos morreram até o 9º dia e animais NOS2^{-/-} morreram até o 14º dia após a infecção por DENV-3. Essas informações prévias nos fizeram questionar o porquê dos animais IFN- γ morreram precocemente em relação aos animais NOS2^{-/-}. Somado o conhecimento adquirido neste trabalho até aqui, levantamos a hipótese de que poderia haver um efeito cooperativo entre NO e o O₂⁻ e que as ações dessas duas espécies conjuntas seriam a expressão mais efetiva do efeito de IFN- γ para a resistência do hospedeiro à infecção pelo vírus da dengue.

Para confirmar esta hipótese, verificamos como se comportariam animais deficientes tanto na produção de NO pela ausência de NOS2 quanto de O₂⁻ pela inibição da formação do complexo NADPH-Oxidase durante a dengue experimental. Para isso,

comparamos as taxas de letalidade de animais IFN- γ ^{-/-} tratados com veículo e animais NOS2^{-/-} tratados com Apocinina após infecção com DENV-3. Animais NOS2^{-/-} tratados com Apocinina sucumbiram à infecção de forma muito semelhante a animais IFN- γ ^{-/-}, sendo que todos os animais IFN- γ ^{-/-} e NOS2^{-/-} tratados com Apocinina morreram até o 8º dia de infecção, enquanto mais de 80% dos animais selvagens tratados com veículo sobreviveram até o 14º dia de infecção. (FIGURA 11a). De maneira comparativa, animais NOS2^{-/-} tratados com veículo ou selvagens tratados com Apocinina morreram até o 12º dia de infecção, tardiamente aos animais IFN- γ ^{-/-} ou NOS2^{-/-} tratados com Apocinina. (FIGURA 11b)

Para analisar as alterações hematológicas e inflamatórias após a infecção por DENV-3, animais selvagens tratados com veículo, animais NOS2^{-/-}, animais selvagens tratados com Apocinina e animais NOS2^{-/-} tratados com Apocinina foram infectados e sacrificados após cinco dias. Neste experimento, não foram observadas alterações nos níveis de hematócrito e plaquetas em animais selvagens, animais NOS2^{-/-} ou em animais selvagens tratados com Apocinina após a infecção. Entretanto, a concomitante deficiência na produção de NO e O₂⁻ induziu uma doença grave com maior nível de hematócrito em relação a todos os outros grupos avaliados já no 5º dia de infecção. Por outro lado, a deficiência isolada da produção de NO, do O₂⁻, ou a deficiência conjunta dessas duas espécies induziram plaquetopenia acentuada após a infecção por DENV-3 (FIGURA 11d).

Em relação ao acúmulo de neutrófilos, não foi observado aumento significativo em relação à atividade da enzima MPO no fígado dos animais selvagens tratados com veículo após a infecção. A deficiência na produção do O₂⁻ pelo tratamento com Apocinina induziu maior acúmulo de neutrófilos no fígado nesse tempo de infecção. Por

outro lado, a deficiência da produção de NO induziu aumento significativo no acúmulo de neutrófilos após a infecção por DENV-3. Entretanto, houve maior acúmulo de neutrófilos no fígado em animais comprometidos da produção de NO e O_2^- após a infecção. Esse aumento foi estatisticamente diferente de todos os outros grupos avaliados, caracterizando uma doença mais grave com mais infiltrado celular já no 5º dia após a infecção em animais $NOS2^{-/-}$ tratados com Apocinina (FIGURA 11e).

Com relação ao perfil de citocinas, não houve diferença na detecção de TNF- α no baço de animais selvagens tratados com veículo após a infecção em relação ao grupo controle não infectado. Entretanto, todos os outros grupos experimentais tiveram aumento na detecção de TNF- α no baço (FIGURA 11f). Por outro lado, mesmo se tratando do 5º dia após a infecção, houve maior detecção de IFN- γ no baço de animais selvagens tratados com veículo em relação ao grupo controle não infectado. Todos os outros grupos avaliados apresentam valores semelhantes aos detectados no grupo selvagem tratado com veículo, se mantendo elevados em relação ao grupo controle não infectado (FIGURA 11g).

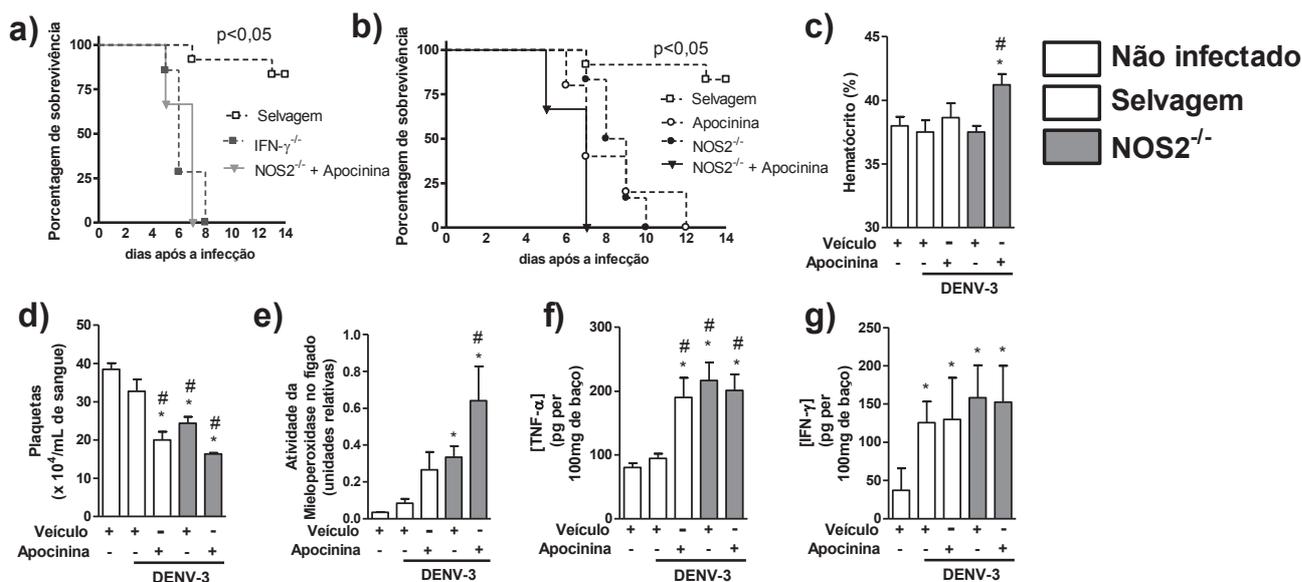


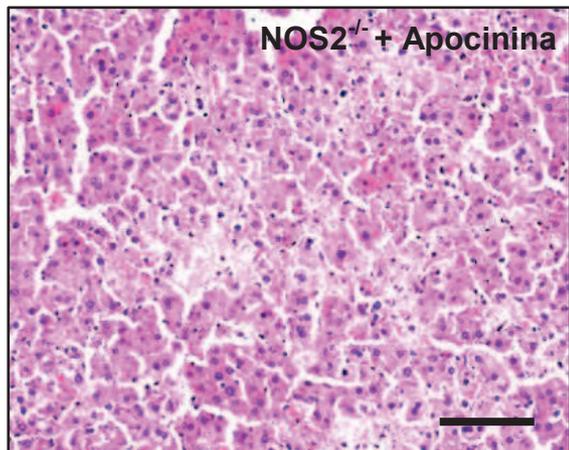
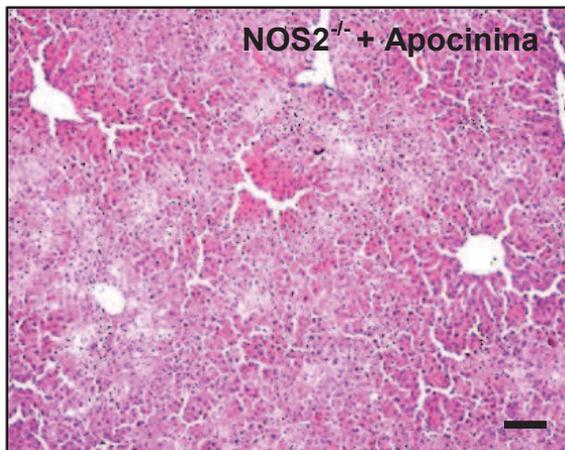
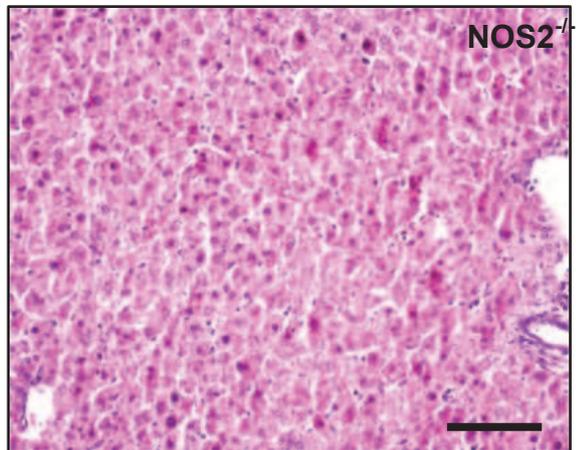
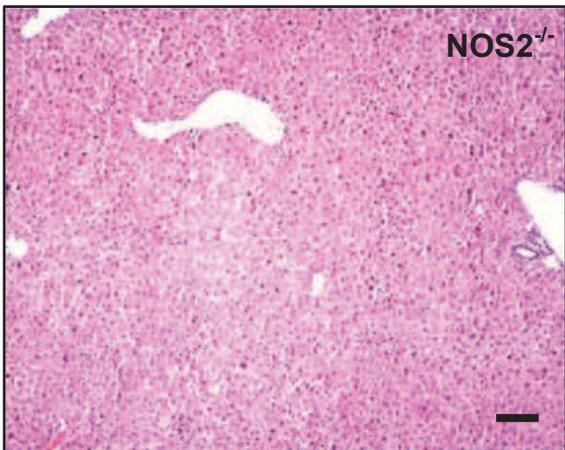
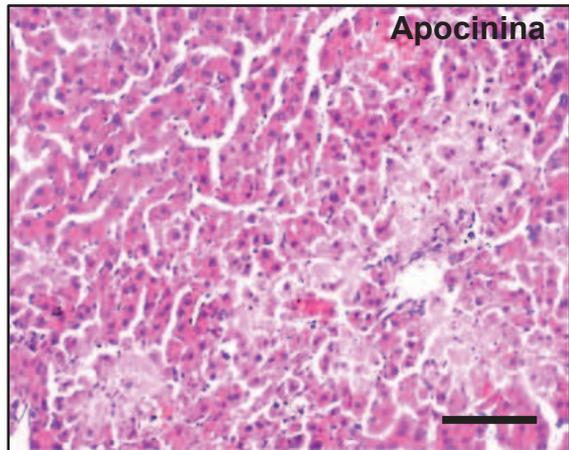
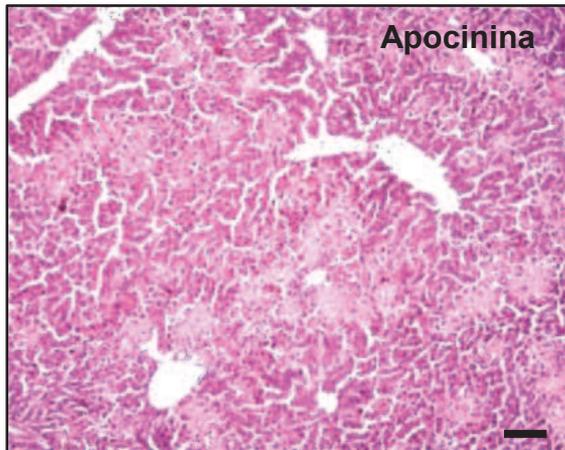
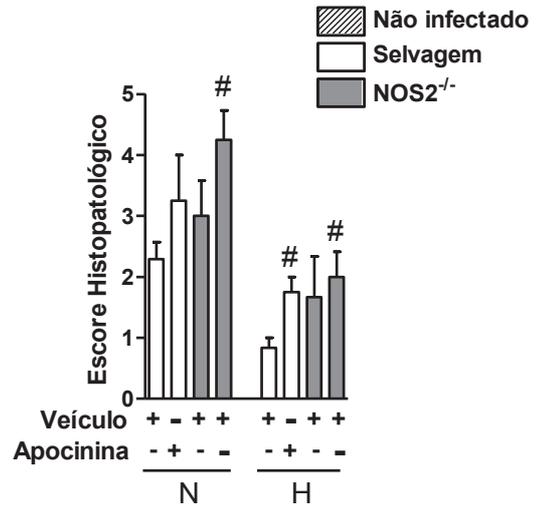
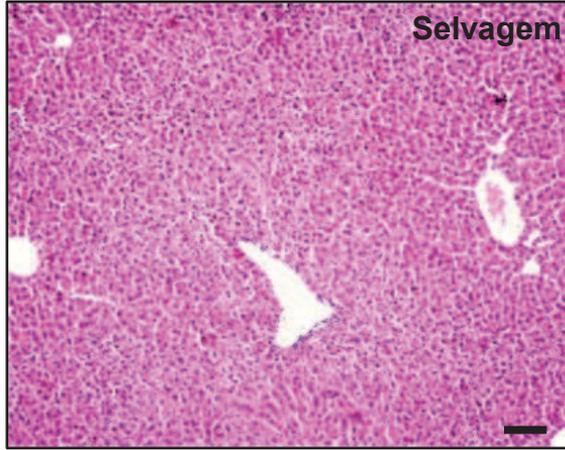
FIGURA 11. O comprometimento concomitante da produção de NO e superóxido resulta no desenvolvimento precoce da doença grave de maneira similar a ausência de IFN- γ após a infecção por DENV-3. (a), camundongos selvagens tratados com veículo e camundongos deficientes em IFN- γ ou NOS2 tratados com apocinina (n=8) foram infectados com 100PFU de DENV-3 i. p. e as taxas de letalidade foram avaliadas diariamente durante 14 dias. Resultados foram expressos como % de sobrevivência. (b), camundongos selvagens tratados com apocinina ou veículo e deficientes em NOS2 tratados com apocinina ou veículo (n=8) foram infectados com 100PFU de DENV-3 i. p. e as taxas de letalidade foram avaliadas diariamente durante 14 dias. Resultados foram expressos como % de sobrevivência. (b-f) camundongos selvagens tratados com apocinina ou veículo e deficientes em NOS2 tratados com apocinina ou veículo foram infectados com 100 PFU de DENV-3 e eutanasiados após sete dias para análise dos seguintes parâmetros: (c), níveis de hematócrito; (d), contagem de plaquetas no sangue; (e), acúmulo de neutrófilos no fígado inferido pela atividade de MPO em unidades relativas; (f) níveis de TNF- α e (g) IFN- γ detectados por ELISA no baço. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e são representativos de pelo menos três experimentos independentes. n=5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo não infectado; #p<0,05 em relação ao grupo selvagem infectado.

Ao analisarmos a lesão hepática e carga viral, vimos que mesmo utilizando um inóculo subletal e fazendo análises no 5º dia após a infecção, a deficiência na produção de NO ou O₂⁻ induziu a formação de áreas de necrose, hemorragia e infiltrado celular. Porém, a deficiência concomitante dessas duas espécies induziu a formação de necroses disseminadas por todo o órgão e áreas maiores de hemorragia e infiltrado celular. Neste

grupo, nas áreas de necrose e seus arredores há vacuolização, cariólise e uma desorganização completa da estrutura dos hepatócitos, resultados similarmente vistos em animais IFN- γ infectados por DENV-3 (COSTA *et al.*, 2012). Animais do grupo NOS2^{-/-} tratados com Apocinina pontuaram mais necrose e hemorragia no fígado em comparação aos animais do grupo selvagem tratado com veículo. Na metodologia aplicada, a pontuação de necrose foi maior nesse grupo do que em todos os outros grupos avaliados (FIGURA 12a).

Ainda, verificamos que a inibição conjunta da produção de NO e do O₂⁻ interferiu diretamente no balanço resistência do hospedeiro à infecção/controla da carga viral de maneira mais significativa em comparação aos outros grupos estudados. Conforme a FIGURA 12b, animais NOS2^{-/-} ou selvagens tratados com Apocinina apresentaram maior carga viral no baço e sangue em relação ao grupo selvagem após a infecção com DENV-3. Entretanto, animais do grupo NOS2^{-/-} tratados com Apocinina tiveram maior carga viral no baço e sangue do que todos os outros grupos avaliados, apresentando um aumento do recuperado viral no sangue e no baço em relação ao grupo selvagem infectado.

a)



b)

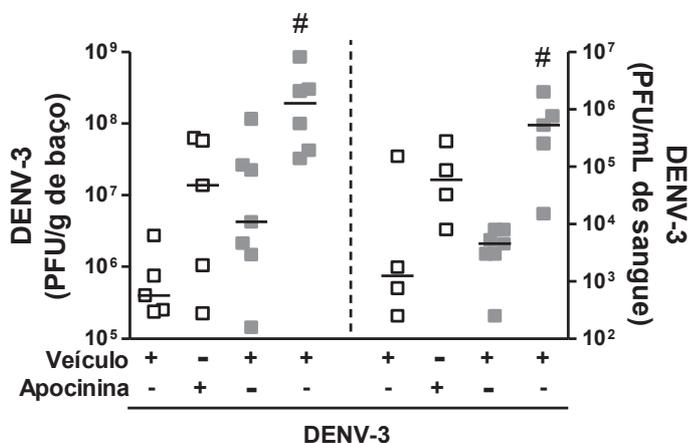


FIGURA 12. O desenvolvimento da doença grave precoce em animais comprometidos da produção concomitante de NO e superóxido está associado à maior lesão hepática e aumento da carga viral. Camundongos selvagens tratados com apocinina ou veículo e deficientes em NOS2 tratados com apocinina ou veículo foram infectados com 100PFU de DENV-3 e eutanasiados após cinco dias para análise dos seguintes parâmetros: (a) lesão hepática avaliada pela análise semi-quantitativa de necrose (N) e hemorragia (H) hepática e coloração por Hematoxilina e Eosina de cortes histológicos do fígado. As barras de escala equivalem a 100 μ m. As imagens apresentadas são representativas de um animal de cada grupo. (b) carga viral recuperada do sangue (painel esquerdo) e do baço (painel direito). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (exceto em (b), expresso por mediana) e são representativos de pelo menos três experimentos independentes. n=5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo não infectado; #p<0,05 em relação ao grupo selvagem infectado.

Em suma, esses resultados demonstram a maior susceptibilidade dos animais NOS2^{-/-} tratados com Apocinina à infecção pelo DENV-3 confirmando o efeito cooperativo entre o O₂⁻ e NO, na resistência do hospedeiro durante a dengue experimental. Além disso, esses animais tem maior dificuldade em conter a replicação viral precocemente em relação aos outros grupos estudados, de forma muito similar ao que observamos previamente em animais IFN- γ ^{-/-}.

4.9. Geração de Peroxinitrito durante a infecção pelo DENV-3

É conhecido que em vários sistemas biológicos o $O_2^{\cdot-}$ pode reagir com NO gerando como produto final o $ONOO^-$ (HUIE & PADMAJA, 1993). Entretanto, a participação dessa espécie durante a dengue experimental ainda era desconhecida até então. Em nosso próximo passo, nos propusemos a verificar a cinética de produção de $ONOO^-$ durante a infecção pelo DENV e em um segundo passo, averiguar se o efeito cooperativo observado entre o $O_2^{\cdot-}$ e NO na resistência do hospedeiro à infecção pelo DENV-3 seria na verdade dependente da geração dessa espécie.

Inicialmente, foram realizados alguns experimentos em animais selvagens para avaliar a cinética de geração de $ONOO^-$ durante a dengue experimental. Após o 5º e 7º dias de infecção, esplenócitos isolados de animais selvagens apresentaram aumento significativo da geração de $ONOO^-$ em relação ao grupo não infetado. (FIGURA 13a).

Por outro lado, a deficiência em $O_2^{\cdot-}$ ou NO induziu prejuízo na geração de $ONOO^-$ após a infecção. Contudo, a deficiência concomitante da produção de NO e $O_2^{\cdot-}$ induziu um prejuízo ainda maior na detecção de $ONOO^-$, uma vez que a média de intensidade de fluorescência de DHR-123 no grupo de animais $NOS2^{-/-}$ tratados com Apocinina foi menor do que a observada em todos os grupos experimentais após infecção (FIGURA 13b).

Similarmente ao que foi visto em esplenócitos isolados de animais $TLR9^{-/-}$ no que diz respeito à geração de ROS, também observamos menor produção de $ONOO^-$ no 5º e 7º dias após a infecção na ausência de TLR9. (FIGURA 13c). Esses dados corroboram nossos achados iniciais confirmando que a ativação de TLR9, por regular a produção do $O_2^{\cdot-}$, também regula a geração de $ONOO^-$.

Para confirmar a especificidade da sonda (DHR-123) utilizada para marcação de ONOO^- , mantivemos esplenócitos isolados de animais infectados com DENV-3 e eutanasiados após sete dias em cultura celular e posteriormente incubamos essas células com concentrações crescentes de FeTPPs, um catalisador da decomposição de ONOO^- . A marcação de DHR-123 se mostrou específica para detecção de ONOO^- *ex vivo*, uma vez que houve diminuição na detecção da média de intensidade de fluorescência nos esplenócitos isolados de maneira concentração-dependente de FeTPPs (FIGURA 13d).

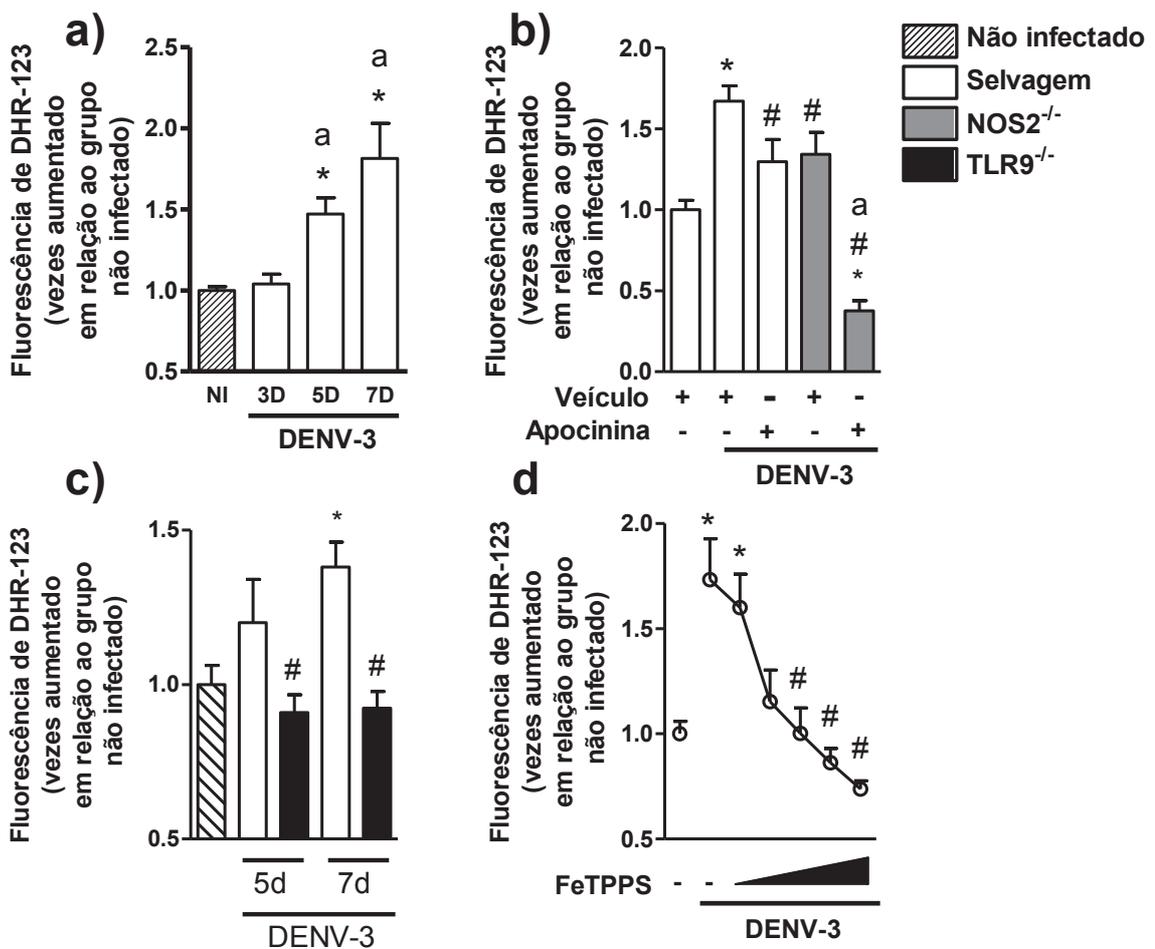


FIGURA 13. A concomitante ausência de NOS2 e inibição do complexo NADPH-Oxidase resulta em maior prejuízo na geração de Peroxinitrito, de maneira semelhante à ausência de TLR9, após a infecção pelo DENV-3. (a) camundongos selvagens foram infectados com 100PFU de DENV-3, i. p. e eutanasiados nos tempos indicados. A análise da produção de Peroxinitrito foi feita em esplênócitos isolados por fluorimetria através da marcação de DHR-123. (b), camundongos selvagens tratados com apocinina ou veículo e deficientes em NOS2 tratados com apocinina ou veículo foram infectados com 100PFU de DENV-3 e eutanasiados após cinco dias. A análise da produção de Peroxinitrito foi feita em esplênócitos isolados por fluorimetria através da marcação de DHR-123. (c) camundongos selvagens ou deficientes em TLR9 foram infectados com 100PFU de DENV-3 e eutanasiados após cinco dias. A análise da produção de Peroxinitrito foi feita em esplênócitos isolados por fluorimetria através da marcação de DHR-123. (d), Animais selvagens foram infectados com 100PFU de DENV-3 e eutanasiados após sete dias. A análise da produção de Peroxinitrito foi feita em esplênócitos isolados por fluorimetria através da marcação de DHR-123, na ausência e presença do catalisador da decomposição de Peroxinitrito (FeTPPs) (0,01 – 100 μ M). Os resultados foram expressos como vezes de aumento sobre a expressão basal do grupo não infectado e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao grupo não infectado; # $p < 0,05$ em relação ao grupo selvagem infectado. ^a $p < 0,05$ em relação aos outros grupos.

4.10. Papel do Peroxinitrito durante a infecção pelo DENV-3

Nossos achados nos sugerem que IFN- γ participa da resistência do hospedeiro à infecção em parte pela geração de ONOO⁻ como produto final. Assim, levantamos a hipótese de que animais com a disponibilidade de ONOO⁻ comprometida se comportariam de maneira muito similar a animais IFN- γ ^{-/-} ou animais NOS2^{-/-} tratados com Apocinina, sucumbindo precocemente à infecção pelo vírus da dengue. Para averiguar essa hipótese, nosso próximo passo foi verificar as taxas de letalidade em animais com comprometimento na disponibilidade de ONOO⁻ durante a dengue experimental. Para isso, animais tratados com FeTPPs ou veículo foram infectados com inóculo subletal de DENV-3 e a taxa de letalidade acompanha durante 14 dias. Conforme a FIGURA 14a, a taxa de letalidade observada no grupo de animais tratados

com FeTPPs foi similar à observada nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ ou nos animais NOS2 $^{-/-}$ tratados com Apocinina após infecção com DENV-3. Nesse experimento, animais tratados com FeTPPs sucumbiram mais à infecção em relação ao grupo selvagem infectado tratado com veículo, sendo que esses animais permaneceram vivos até o 9º dia de infecção, enquanto aproximadamente 60% dos animais tratados com veículo sobreviveram até o 14º dia de infecção.

Nosso próximo passo foi avaliar as alterações hematológicas e inflamatórias nesses animais. Para isso, animais tratados com veículo ou FeTPPs foram infectados e sacrificados após cinco dias. Novamente, esse tempo foi escolhido devido a similaridade observada entre o grupo de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ e o grupo tratado com FeTPPs diante da infecção por DENV-3. Neste experimento, o inóculo utilizado não gerou alterações hematológicas significativas em animais tratados com veículo. Porém, animais tratados com FeTPPs apresentaram valores maiores de hematócrito e plaquetopenia mais acentuada após a infecção (FIGURA 14b-c).

Além disso, o inóculo utilizado não gerou aumento significativo na atividade da enzima MPO no fígado de animais tratados com veículo. Contudo, o tratamento com FeTPPs induziu aumento na atividade dessa enzima no fígado mesmo no 5º dia após a infecção (FIGURA 14d). Com relação ao perfil de citocinas, não houve diferença na detecção de TNF- α ou IFN- γ no baço de animais infectados e tratados com veículo em relação ao grupo controle não infectado. Entretanto, no grupo infectado tratado com FeTPPs os níveis de ambas as citocinas foram significativamente aumentados em relação a todos os outros grupos avaliados (FIGURA 14e-f).

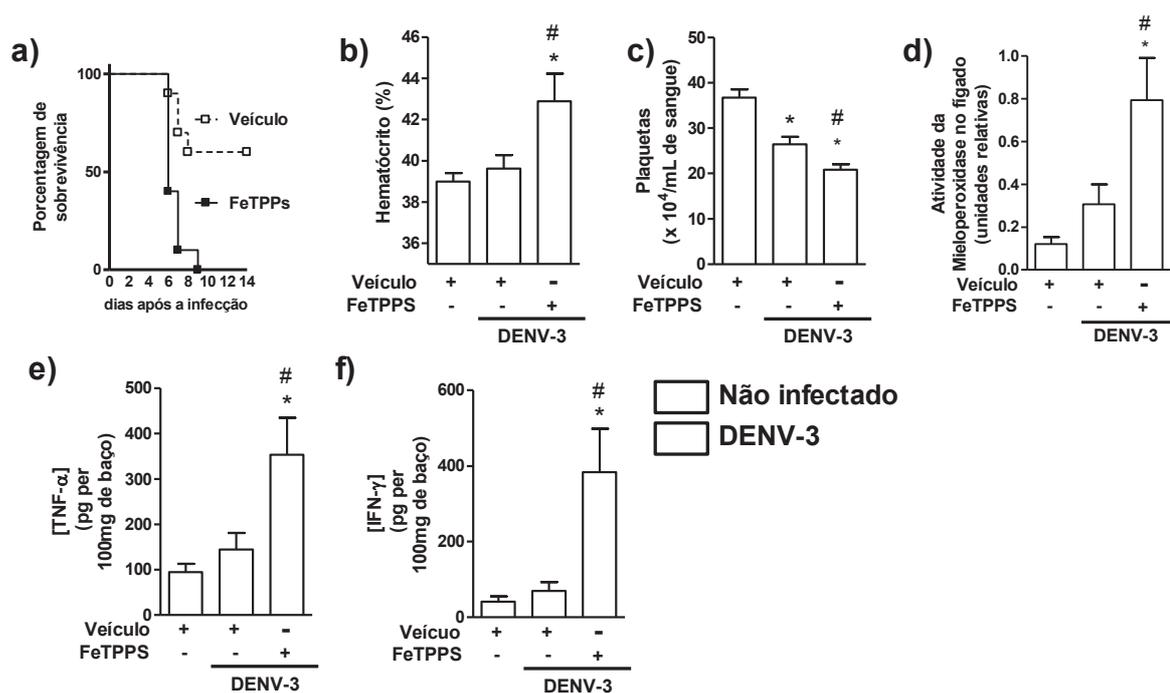


FIGURA 14. A catalisação da decomposição de Peroxinitrito após a infecção pelo DENV-3 resulta na manifestação precoce da doença mais grave. (a), Camundongos selvagens tratados com veículo ou FeTPPs (n=8) foram infectados com 100PFU de DENV-3, i. p. e as taxas de letalidade foram avaliadas diariamente durante 14 dias. Resultados foram expressos como % de sobrevivência. (b), camundongos selvagens tratados com veículo ou FeTPPs foram infectados com 100PFU de DENV-3, i. p. e eutanasiados após cinco dias para análise dos seguintes parâmetros: (b), níveis de hematócrito e (c), contagem de plaquetas no sangue; (d), acúmulo de neutrófilos no fígado inferido pela atividade de MPO em unidades relativas e (e) níveis de TNF- α e (f) IFN- γ detectados por ELISA no baço. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e são representativos de pelo menos três experimentos independentes. n=5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo não infectado; #p<0,05 em relação ao grupo selvagem infectado.

Ao analisarmos a lesão hepática e carga viral, verificamos que a histologia do fígado em animais infectados tratados com FeTPPs evidenciou intensas áreas de necroses disseminadas por praticamente todo o órgão. Além disso, foi possível observar grandes áreas de hemorragia e infiltrado celular no fígado desses animais quando comparados a animais infectados tratados com veículo. As áreas de necrose invadem

aproximadamente todo o fígado e nos seus arredores há vacuolização, cariólise e uma desorganização total da estrutura dos hepatócitos (FIGURA 15a). No escore histopatológico, animais infectados tratados com FeTPPs pontuaram mais necrose e mais hemorragia no fígado em comparação aos animais do grupo infectado tratados com veículo. Além disso, verificamos que a catalisação da decomposição de ONOO^- por FeTPPs interferiu diretamente no balanço resistência do hospedeiro à infecção/controla da carga viral. Conforme a FIGURA 15b, animais infectados tratados com FeTPPs apresentaram aumento da carga viral no baço em relação ao grupo tratado com veículo.

a)

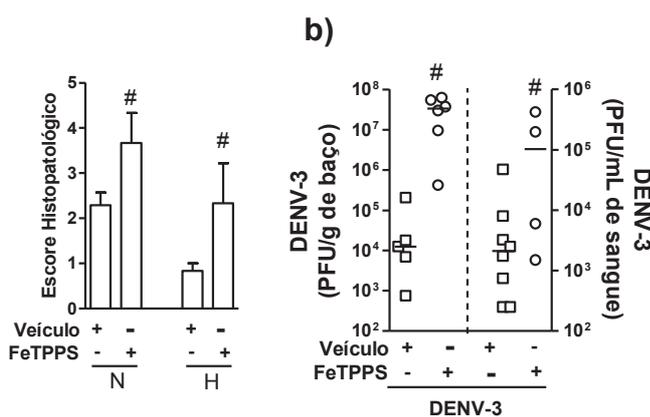
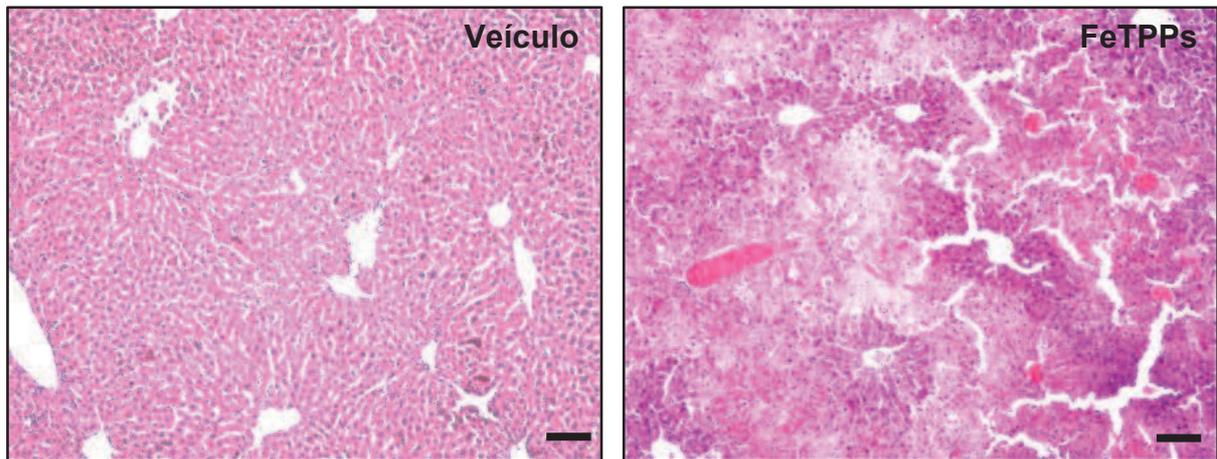


FIGURA 15. O desenvolvimento da doença grave precoce em animais selvagens comprometidos de Peroxinitrito após a infecção pelo DENV-3 é seguido por maior lesão hepática e aumento da carga viral. Camundongos selvagens tratados com FeTPPs foram infectados com 100PFU de DENV-3 e eutanasiados após cinco dias para análise dos seguintes parâmetros: (a) lesão hepática avaliada pela análise semi-quantitativa de necrose (N) e hemorragia (H) hepática (modificada de PAES *et al.*, 2009) e coloração por Hematoxilina e Eosina de cortes histológicos do fígado. As barras de escala equivalem a 100 μm . As imagens apresentadas são representativas de um animal de cada grupo. (b) carga viral recuperada do sangue (painel esquerdo) e do baço (painel direito). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (exceto em (b) expresso por mediana) e são representativos de pelo menos três experimentos independentes. n=5 animais por grupo. *p<0,05 em relação ao grupo não infectado; #p<0,05 em relação ao grupo selvagem infectado.

Esses resultados demonstram a maior susceptibilidade dos animais tratados com FeTPPs ao DENV-3, além da maior dificuldade desse grupo em conter a replicação viral, confirmando que o efeito cooperativo entre o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e NO na resistência do hospedeiro durante a dengue experimental é na verdade dependente da geração de ONOO $^-$.

4.11. Ação antiviral do Peroxinitrito *in vitro*

Os dados anteriores sugeriram que o ONOO $^-$ deve possuir considerável atividade antiviral podendo inibir a replicação do vírus da dengue, tornando-se assim, parte fundamental na resistência do hospedeiro à infecção. Entretanto, ainda não havíamos demonstrado se esta hipótese era verdadeira. Assim, nosso último passo nesse trabalho foi verificar a possível capacidade antiviral do ONOO $^-$ *in vitro*, comparando-a aos efeitos de NO e H_2O_2 no mesmo sistema biológico.

Verificamos que a replicação viral foi comprometida no sobrenadante de células LLC-MK2 na presença de SIN-1 de maneira concentração-dependente (FIGURA 16a). Por outro lado, a presença de H_2O_2 não comprometeu a replicação viral em nenhuma

concentração avaliada (FIGURA 16b). O mesmo experimento foi realizado utilizando-se as mesmas concentrações de NPS, porém as concentrações utilizadas desse composto foram tóxicas para as células levando a morte celular avaliado pelo ensaio de MTT (dados não mostrados).

Esses dados confirmaram nossa hipótese, demonstrando que de fato, ONOO^- possui considerável atividade antiviral podendo inibir a replicação do vírus durante a dengue experimental.

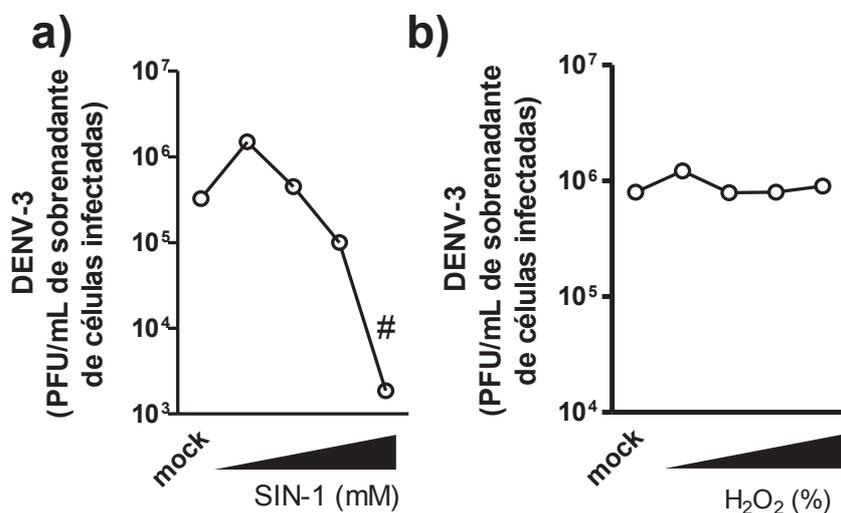


FIGURA 16. O Peroxinitrito inibe a replicação do vírus da dengue. Células da linhagem LLC-MK2 foram infectadas utilizando 0,1 M.O.I. de DENV-3 na presença ou não de (a) doador de Peroxinitrito, SIN-1 (0,1mM a 3mM) e (b) H₂O₂ (0,0001% a 0,1%) durante 48 horas. As unidades formadoras de placas foram recuperadas por titulação dos sobrenadantes obtidos das culturas. Os resultados foram expressos como mediana e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Para todos os experimentos a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de MTT. n=3 poços por grupo. #p<0,05 em relação ao grupo mock.

5. *DISCUSSÃO*

Nós demonstramos neste estudo que a resistência à infecção pelo vírus da dengue está associada à ativação da imunidade inata, particularmente à ativação de TLR9, e aqui, inferimos que padrões moleculares associados à lesão podem ter participação efetiva nesse processo. Uma vez ativada, essa via induz a geração de componentes-chave à resistência do hospedeiro à infecção e ao controle da carga viral como $O_2^{\cdot-}$ e NO que, de forma combinada, resultam na geração de $ONOO^-$ para uma resposta mais efetiva.

Podemos sustentar essa conclusão através dos seguintes achados: níveis elevados de DNA mitocondrial são detectados no soro de humanos e camundongos durante a infecção pelo vírus da dengue. Esse material pode ser reconhecido por receptores da imunidade inata, entre esses, TLR9; a ausência de TLR9 compromete a produção de IL- 1β e IFN- β , além de IFN- γ , porém induz a manifestação mais grave da doença após a infecção pelo DENV-3; IFN- γ atua no controle da replicação viral induzindo a expressão de gp91^{phox} e NOS2 e consequente geração de $O_2^{\cdot-}$ e NO; o prejuízo na geração de $O_2^{\cdot-}$ e NO concomitantemente interfere na geração de $ONOO^-$; e por fim, $ONOO^-$ possui atividade antiviral, inibindo a replicação do vírus da dengue, e a catalisação da sua decomposição por FeTPPs propicia aumento da replicação viral, desenvolvimento da doença grave e morte.

Nesse trabalho, partimos do conhecimento prévio de que a dengue causa lesão e morte celular sendo que muitos autores tem relatado um processo inflamatório sistêmico com presença de várias citocinas como sinal desencadeador da doença grave nessas condições (LIN *et al.*, 2002; HALSTEAD, 2003; ROTHMAN, 2003). Acredita-se que o mecanismo de desenvolvimento da forma grave da doença/FHD/SCD envolva a ativação de macrófagos e células dendríticas infectadas com o vírus (KYLE *et al.*, 2008a-b) resultando na produção de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL- 1β (HOBER *et*

al., 1993, YANG *et al.*, 1995, HOBER *et al.*, 1996 b). Essas citocinas têm sido associadas a uma resposta inflamatória de fase aguda, podendo resultar na liberação de peptídeos quimiotáticos e ativação de células endoteliais vasculares levando ao aumento da permeabilidade vascular e morte celular, dessa forma contribuindo para a patogênese da doença (ANDERSON *et al.*, 1997; MISRA *et al.*, 1996a-b; RATHAKRISHNAN *et al.*, 2012).

Assim, em um contexto epidêmico real durante a epidemia de Dengue em Belo Horizonte em 2010, nosso primeiro passo neste trabalho foi investigar componentes inflamatórios relacionados à progressão da doença e a morte celular em pacientes com dengue ou outras doenças febris, consecutivamente admitidos com suspeita de dengue em uma unidade básica de saúde. Todos os pacientes que tiveram diagnóstico de dengue confirmada neste estudo foram diagnosticados com quadro de dengue clássica, assim não foi possível uma correlação dos nossos achados ao desenvolvimento da FHD/SCD. Entretanto, mesmo na dengue clássica, verificamos a presença de marcadores moleculares como sTNFR2 ou DNA mitocondrial no soro que se correlacionaram com a progressão da doença (dias de sintomas) nessas condições.

Poucos pacientes produziram IL-1 β no nosso estudo. Esses dados corroboram achados durante outras epidemias, onde foi visto que citocinas como IL-1 β ou TNF- α são pouco detectadas no soro de pacientes na febre clássica do dengue. PINTO e colaboradores (1999), durante a epidemia de dengue daquela década na cidade do Rio de Janeiro, também relataram apenas uma amostra reatora para IL-1 β em um total de 31 pacientes incluídos no estudo. BOZZA e colaboradores (2009), anos depois, demonstraram em outro estudo, ainda na capital fluminense, que níveis muito baixos a inexistentes de IL-1 β foram detectados em pacientes diagnosticados com quadro moderado da doença, sendo que esses valores foram vistos aumentados apenas em

pacientes diagnosticados com FDH/SCD. Correlacionando esses dados ao nosso estudo, inferimos que essa citocina de fato não é detectada comumente na dengue clássica, estando possivelmente presente apenas em pacientes com evolução à FHD/SCD. Muitos estudos têm sido feitos em pacientes nessa fase da doença na busca de marcadores que estariam relacionados ao desenvolvimento desse quadro. Nesse contexto, MAIRUHU e colaboradores (2005), demonstraram que a detecção de PTX-3 no soro de pacientes poderia ser útil como marcador da progressão da doença em humanos. Em um estudo feito durante um surto de dengue na Indonésia, esses autores verificaram que pacientes diagnosticados com febre do dengue apresentaram valores detectáveis de PTX-3 já nos primeiros dias de sintomas da doença, porém os níveis dessa citocina foram aumentados consideravelmente após a evolução do quadro à FHD/SCD. De maneira comparativa, no nosso estudo poucos pacientes produziram concentrações significativas de PTX-3. É importante contextualizar que o estudo de MAIRUHU e colaboradores, (2005) foi feito em um contexto epidemiológico restrito, isolado a pacientes hospitalizados em uma clínica pediátrica, sendo que 50 crianças entre sete e treze anos foram incluídas no estudo, por outro lado, nosso estudo foi conduzido em pacientes adultos não hospitalizados que apresentavam em sua maioria sintomas de doença branda. Além disso, diferentes sorotipos do vírus podem apresentar diferentes graus de virulência (GUBLER *et al.*, 1978; HALSTEAD, 2008). Assim, entendemos que a gravidade dos sintomas da doença, idade e sorotipo do vírus interferem nos níveis de PTX-3 detectados no soro durante a dengue, e aqui verificamos que pacientes com sintomas leves da doença apresentaram níveis baixos de dessa citocina no soro.

Citocinas inflamatórias não são utilizadas na prática clínica como marcadores inflamatórios de progressão da doença às formas mais graves (ST JOHN *et al.*, 2013). Entretanto, no nosso estudo verificamos aumento na detecção de sTNFR1 e sTNFR2

mesmo na dengue clássica, de forma que o aumento desses receptores solúveis no soro pode indicar a instalação de um processo inflamatório sistêmico (WANG *et al.*, 2007). Receptores solúveis de TNF têm sido descritos como capazes de atenuar os efeitos de TNF- α através da ligação à sua forma livre no soro e são comumente classificados como componentes anti-inflamatórios antagonizando os efeitos de TNF- α (PAPACHRISTOU *et al.*, 2004). Como TNF- α normalmente tem um tempo de meia-vida muito curto, a detecção dos receptores solúveis de TNF no soro é a evidência da ativação inflamatória para a produção de TNF- α . Assim, a dosagem sérica de sTNFR1 e 2 tem sido útil como marcador de progressão de muitas doenças em que o processo inflamatório participa na evolução às suas formas mais graves, incluindo infecções por HIV (HATTORI *et al.*, 1997), Influenza (LEE *et al.*, 2011) e até mesmo a FHD/SCD (HOBER *et al.*, 1996). No nosso estudo, verificamos que os níveis de sTNFR1 e sTNFR2 foram aumentados na dengue clássica, entretanto a presença de sTNFR2 no soro parece ter relação com a cinética da doença ao longo dos dias de sintomas, tornando a análise desse componente útil como marcador de progressão da doença e inflamação sistêmica.

Nós verificamos que a inflamação sistêmica com participação da resposta inflamatória é prevalente durante a dengue clássica. A proteína E viral induziu níveis mais elevados de IL-6 e TNF- α em PMBCs isolados de pacientes com dengue, e não exerceu nenhum efeito sobre a produção de citocinas antiinflamatórias como IL-10 e IL-4. No nosso estudo verificamos que a Proteína E não foi capaz de induzir tal resposta em indivíduos saudáveis. Sabe-se que IL-6 e TNF- α estão associados a quadros mais graves da doença. Além disso, a produção de CXCL-8/IL-8, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 α e CCL4/ MIP-1 β é detectada em culturas de células HepG2 infectadas com o vírus e estimuladas com TNF- α ou IL-6 resultando em apoptose das células (MATSUDA *et al.*, 2005; MEDIN *et al.*, 2005). Nossos dados demonstram que a

proteína E tem efeito indutor da produção dessas citocinas. Assim, esse componente poderia estar participando da ativação inflamatória seguida da indução de morte celular mesmo na dengue clássica.

Nós verificamos que concentrações aumentadas de DNA mitocondrial foram detectadas no soro principalmente no 7º dia de sintomas da doença. Agrupando os dados por fases da doença, precoce (1 a 3 dias de sintomas) e tardia (4 a 7 dias), esse aumento continua notório na fase tardia. Níveis elevados de DNA circulante no plasma de pacientes com câncer de ovário (ZACHARIAH *et al.*, 2008), artrite reumatoide (ZHONG *et al.*, 2007) e sepse (RHODES *et al.*, 2006) têm sido relatados como marcadores de progressão para formas mais graves dessas doenças. Em dengue, HA e colaboradores, (2011), avaliaram os níveis de DNA livre circulante em pacientes internados que desenvolveram FHD/SCD. Nesse estudo, a presença desse marcador no soro correlacionou-se fortemente à gravidade da doença nos pacientes. Nossos dados acrescentam, no entanto, que mesmo na dengue clássica há liberação de DNA mitocondrial no soro dos pacientes. Porém, no nosso estudo não foi possível traçar uma correlação entre esses dados e o desenvolvimento da FHD/SCD, uma vez que todos os pacientes incluídos apresentaram quadro de dengue clássica.

Além disso, durante a dengue experimental, nós verificamos morte celular e liberação em massa de DNA mitocondrial no soro de camundongos infectados com DENV-3 precocemente em relação à instalação da doença grave. De maneira interessante, foi observado que os níveis de DNA mitocondrial no soro dos animais foram expressivamente aumentados já no 5º dia em relação ao grupo não infectado, permanecendo elevados no sétimo dia após a infecção período considerado como o pico da doença no nosso modelo experimental. Esses dados corroboram os achados em humanos que desenvolveram a FHD/SCD relatados por HA e colaboradores (2011),

uma vez que nosso modelo experimental de infecção apresenta características de doença grave, muito similares a esse quadro. Contudo, nossos achados inferem também que mesmo na doença leve ou moderada há morte celular com liberação de quantidades significativas de DNA mitocondrial em períodos anteriores ao pico da doença. O aumento observado é suficiente para induzir um processo de ativação inflamatória sistêmica, induzindo a migração celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (MARQUES *et al.*, 2012).

Uma vez que a dengue induz a liberação de DNA mitocondrial no soro, esse material pode ativar vias de sinalização intracelulares dependentes do reconhecimento pela imunidade inata. Já é conhecido que TLR9 reconhece DNA mitocondrial podendo desencadear uma resposta intracelular levando à indução de citocinas pró-inflamatórias (AKIRA *et al.* 2006, BLASIUS *et al.*, 2010, KAWAI & AKIRA, 2011). Nós verificamos que animais ausentes de TLR9 infectados com DENV-3 sucumbem mais a infecção em relação a animais selvagens. De fato, a doença se manifesta de forma muito mais agressiva nesses animais, visto que, mesmo um inóculo subletal que normalmente não evolui à doença tão grave em animais selvagens foi capaz de induzir uma doença grave com aumento de hematócrito e plaquetopenia, quadros comuns observados na dengue grave. Além disso, observamos acúmulo de neutrófilos no fígado, processo normalmente associado à maior lesão tecidual (CHEN *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2012) o que foi confirmado quando detectamos maiores níveis de AST no soro ou analisamos a histologia desse órgão. De fato, o aumento de áreas de necrose celular seguido de hemorragia no fígado foram as características mais marcantes na análise histológica obtidas desse grupo. Esses dados demonstram que há mais lesão tecidual na ausência de TLR9, o que é explicado pela manifestação de uma doença mais grave, caracterizada pelos parâmetros observados.

O papel de TLR9 na dengue é pouco elucidado. Esse receptor não é descrito como capaz de reconhecer vírus de (+)ssRNA como o vírus da dengue, porém, são especializados no reconhecimento de CpG DNA. Entretanto, esse receptor é superexpresso em células dendríticas mesmo na dengue clássica. Em um estudo durante um surto de dengue na Colômbia em 2012, TORRES e colaboradores analisaram 30 amostras de pacientes e verificaram aumento da expressão de TLR3 e TLR9 em células dendríticas mielóides e plasmocitóides isoladas de pacientes com febre clássica do dengue (TORRES *et al.*, 2013). Esses dados reforçam a ideia de que a estimulação de TLR9 é de fato necessária à resistência do hospedeiro à infecção e inferem que durante a infecção pelo vírus da dengue o hospedeiro aos primeiros sinais de lesão e morte celular já é capaz de montar uma resposta a fim de se prevenir ao desenvolvimento da doença grave. Isso se daria em parte pela ativação de TLR9 e a consequente indução de um estado de inflamação “benéfico” que contribuiria para o controle da replicação viral e amenização da doença.

Nossos achados sustentam essa hipótese, visto que no nosso estudo a ausência de TLR9 também desencadeou uma falha na resposta inflamatória. Animais TLR9^{-/-} não apresentaram prejuízo na indução de TNF- α após a infecção, porém os níveis dessa citocina permaneceram altos em relação ao grupo não infectado, mantendo o quadro inflamatório observado após a infecção. A presença de TNF- α normalmente é associada à lesão e inflamação sistêmica (ATRASHEUSKAYA *et al.*, 2003). Entretanto, verificamos que a indução de IL-1 β , IFN- β e IFN- γ foram comprometidas na ausência de TLR9, o que explica, em parte, a incapacidade de controlar a evolução à doença grave observada nos animais deficientes nesse receptor.

TLR9 pode ativar mais de uma via de sinalização em diferentes compartimentos intracelulares. A estimulação de TLR9 por CpG-DNA leva a translocação desses

receptores para o endossoma e indução de citocinas induzidas por NF- κ B por vias dependentes de MyD88-TRAF6. Por outro lado, esses receptores também podem translocar-se para outras organelas como organelas relacionadas ao endossoma (LRO) onde ocorre a incorporação de TRAF3 e indução de IFN-I via mobilização e ativação de IRF7 (SASAI *et al.*, 2010).

A participação de IFN-I na indução de componentes antivirais na dengue é bem estabelecida (RODRIGUEZ-MADOZ *et al.*, 2010 a-b, NASIRUDEEN *et al.*, 2011, LIANG *et al.*, 2011). Porém, pouco se sabe sobre a participação de IL-1 β na doença. Entretanto, recentemente foi demonstrado que a infecção pelo vírus da dengue *in vitro* é capaz de induzir a produção dessa citocina em macrófagos inflamatórios (M1) levando à morte celular por piroptose (WU *et al.*, 2013). Nesse contexto, esses autores demonstraram que componentes essenciais a indução e maturação dessa citocina sofrem regulação positiva em macrófagos M1. Após a infecção pelo vírus da dengue, maiores quantidades de transcrito de mRNA de pro-IL-1 β foram vistos nesse tipo celular *in vitro*, o que foi seguido de maiores quantidades de transcrito de mRNA de pro-caspase-1 e NLRP3. Esses achados remetem que a ativação de inflamassomas parece ser importante na resistência do hospedeiro à infecção pelo vírus da dengue, uma vez que esses componentes podem induzir a clivagem de pro-caspase-1 resultando na maturação de pro-IL-1 β e maior disponibilidade dessa citocina na sua forma ativa: IL-1 β .

Resultados ainda não publicados vistos *in vivo* pelo nosso grupo demonstraram que animais tratados com antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) sucumbiram mais a infecção pelo DENV-2 apresentando maior carga viral e lesão tecidual em relação a animais selvagens infectados. Posteriormente, esses dados foram complementados pela análise desses mesmos parâmetros em animais IL-1 $\beta^{-/-}$ e IL-1R $^{-/-}$ após a infecção por DENV-2, onde o mesmo fenótipo foi observado. A ação benéfica de IL-1 β durante a

dengue experimental pode ser em parte atribuída à indução de NO, uma vez que foi verificado que essa citocina foi capaz de induzir a expressão de NOS2, sendo esse um dos prováveis mecanismos pelos quais esse sistema controla a replicação viral e mantém a sobrevivência durante a infecção. Diante desses resultados, podemos afirmar que a indução de IL-1 β por TLR9 está envolvida na resistência do hospedeiro à infecção, porém, investigações adicionais são necessárias para se compreender outros mecanismos pelos quais essa citocina exerce seus efeitos durante a doença.

No nosso estudo, nós não verificamos alterações significativas nos níveis de IL-1 β em humanos que apresentaram quadro de dengue clássica, porém esses dados somados aos obtidos em camundongos nos levam a crer que essa citocina deve ser produzida preferencialmente durante a dengue grave, o que é evidenciado por outros estudos que relataram maior concentração de IL-1 β em soro de humanos na FHD/SCD (PINTO *et al.*, 1999; BOZZA *et al.*, 2008).

A ativação de inflamassomas como NLRP3 que clivam pro-caspase-1 e consequentemente pró-IL-1 β tem sido recentemente estudada durante a dengue (WU *et al.*, 2013). Porém, sabe-se que esse complexo ativado induz também a clivagem e maturação de pro-IL-18, o que pode contribuir para a resistência do hospedeiro à infecção. De fato, recentemente nosso grupo demonstrou que essa citocina é essencial ao controle da replicação viral e desenvolvimento da doença grave durante infecções por DENV-2 e por DENV-3 (FAGUNDES *et al.*, 2011, COSTA *et al.*, 2012). Finalmente, esses autores demonstraram que IL-18 exerce seus efeitos em parte pela indução de IFN- γ .

De maneira interessante, aqui nós verificamos que a produção de IFN- γ também é prejudicada na ausência de TLR9 após a infecção pelo DENV-3, sendo que a ativação dessa via parece ser um dos principais mecanismos pelos quais esse receptor participa

da resistência à infecção. Citocinas induzidas por essa via (IL-12 ou IL-18) devem contribuir nesse processo ativando células residentes, incluindo células NK (LAUZON *et al.*, 2006; HAEBERLEIN *et al.*, 2010; TANAKA *et al.*, 2011; SOUZA-FONSECA-GUIMARAES *et al.*, 2012). Além disso, uma “ponte” entre a imunidade inata e adaptativa inicialmente também deve ser considerada, culminando na indução de IFN- γ em outros tipos celulares (por exemplo, em linfócitos TCD4⁺). No entanto, estudos futuros devem ser conduzidos para averiguar essas hipóteses.

A ação “benéfica” de IFN- γ durante a infecção pelo vírus da dengue é bem estabelecida. SHRESTA e colaboradores, (2004b) foram pioneiros em demonstrar a importância do sistema IFN- γ em restringir a replicação viral e eliminar o vírus após a infecção primária pelo vírus da dengue. Ainda, a correlação entre o aumento da produção de IFN- γ às altas taxas de sobrevivência observadas em pacientes com FHD/SCD corroboram essa afirmação (CHEN *et al.*, 2006a-b).

Em adição a esses achados, nosso grupo demonstrou recentemente que IFN- γ normalmente é produzido precocemente, no 5º dia, após a infecção em camundongos, semelhantemente em infecções por DENV-2 ou DENV-3, sendo que animais deficientes em IFN- γ sucumbiram à infecção em até oito dias quando infectados com inoculo subletal do vírus (FAGUNDES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012), dados que foram reproduzidos no nosso trabalho. Essas evidências confirmam que IFN- γ é essencial para o controle do hospedeiro a replicação do vírus da dengue e a resistência à infecção (FAGUNDES *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012). Além disso, investigando mais profundamente os mecanismos, os mesmos autores demonstraram que IFN- γ exerce seu efeito protetor pela indução de NOS2 e consequente geração de NO.

Já é demonstrado que após a infecção pelo vírus da dengue, a expressão de NOS2 sofre regulação positiva com consequente geração de NO. Em um estudo

utilizando monócitos periféricos isolados de sangue de pacientes com dengue, foi visto que a expressão dessa enzima se correlacionou à fase aguda da doença e precedeu o *clearance* do vírus em monócitos (NEVES-SOUZA *et al.*, 2005). Além disso, a produção aumentada de NO normalmente tem sido associada às manifestações menos graves da doença em humanos (VALERO *et al.*, 2002). Finalmente, já é conhecido que NO é capaz de inibir a replicação do vírus da dengue *in vitro* em células humanas, (CHARNSILPA *et al.*, 2005), efeito que é associado à inibição da atividade de polimerases associadas ao vírus da dengue por essa espécie (TAKHAMPUNYA *et al.*, 2006).

Entretanto, nós demonstramos que a produção de NO dependente de NOS2 parece não ser o único efeito associado à ação de IFN- γ na resposta do hospedeiro à infecção pelo DENV. Corroborando essa afirmação, muitos autores tem relatado que essa citocina pode atuar como um importante indutor da geração de O₂⁻ em vários processos (PEARL-YAFE *et al.*, 2003; SASAKI *et al.*, 2008; WATANABE *et al.*, 2003, SEIFERT *et al.*, 2010).

Neste trabalho, nós elucidamos um mecanismo mais abrangente pelo qual IFN- γ exerce seu efeito protetor durante a dengue: a indução de gp91^{phox} e consecutiva geração de O₂⁻. Nós demonstramos que durante a infecção pelo DENV-3, a expressão de gp91^{phox} e geração de ROS aumentam de maneira tempo-dependente, sendo o complexo NADPH-oxidase o principal mantenedor da geração dessas espécies durante a doença. No nosso estudo, a expressão dessa proteína foi aumentada já no 5º dia de infecção, de maneira similar ao aumento da expressão de NOS2 relatada por FAGUNDES e colaboradores, (2011) e COSTA e colaboradores, (2012). Além disso, demonstramos que animais deficientes em IFN- γ apresentaram redução significativa nas quantidades de transcrito de mRNA de gp91^{phox} e na geração de ROS após a infecção com DENV-3.

Esses achados, somados ao conhecimento prévio das ações de IFN- γ sobre o complexo NADPH-Oxidase em outros sistemas, expandem nosso conhecimento sobre as ações dessa citocina durante a infecção pelo vírus da dengue.

De maneira interessante, nós demonstramos que há uma interação entre espécies reativas (ou radicais livres), induzidas (os) por essa citocina durante a dengue experimental a fim de controlar mais efetivamente a replicação viral e o desenvolvimento da doença grave. Radicais livres podem desencadear ações deletérias ou benéficas durante infecções virais, o que depende da concentração, da população celular envolvida e do processo infeccioso em questão (PADALKO *et al.*, 2004). VLAHOS e colaboradores, (2011), demonstraram que ROS induzem efeito deletério ao organismo durante a infecção pelo vírus da Influenza A, uma vez que a inibição da geração dessas espécies ameniza a inflamação pulmonar com diminuição da carga viral. Ainda seguindo esse raciocínio, YEN e colaboradores, (2008), demonstraram que ROS e RNS derivadas de células endoteliais estão envolvidas no desenvolvimento da hemorragia durante a infecção pelo vírus da dengue.

Entretanto, ROS também têm sido apontadas como componentes-chave para a resistência do hospedeiro durante várias infecções virais. Por exemplo, sabe-se que ROS são capazes de suprimir a replicação do vírus da hepatite A em células de hepatoma humano *in vitro* (CHOI *et al.*, 2004) e que a essas espécies medeiam a ativação de STAT-1 e 2 induzida por vírus, regulando essa via durante a infecção pelo vírus respiratório sincicial (RSV). Em suma, as ações de ROS sobre esses mecanismos contribuem para a resistência à infecção por esses vírus (LIU *et al.*, 2003). Porém, nós demonstramos que ROS por si só parece não possuir atividade antiviral contra o DENV-3. No nosso estudo, a presença de H₂O₂ *in vitro* foi incapaz de inibir da replicação do DENV-3 em culturas de células LLC-MK2 infectadas com DENV-3.

Contudo, nos verificamos que apesar disso a resposta efetiva contra o vírus da dengue é dependente da geração de $O_2^{\cdot-}$. Animais infectados com DENV-3 comprometidos da geração dessa espécie, seja pela ausência da proteína gp91^{phox} ou pela inibição da formação do complexo NADPH-Oxidase com tratamento farmacológico, sucumbem mais a infecção em relação a animais selvagens. De maneira semelhante a animais TLR9^{-/-}, a doença se manifesta de forma muito mais agressiva nesses animais visto que um inóculo subletal foi capaz de induzir doença grave com aumento de hematócrito e plaquetopenia. Além disso, observamos concentrações altas de TNF- α e IFN- γ nesses animais além de acúmulo de neutrófilos no fígado o que foi seguido de mais lesão tecidual. Assim, mesmo com as sugestões prévias sobre os efeitos deletérios da geração de ROS durante a dengue (YEN *et al.*, 2008), nossos dados sustentam a idéia de que a produção de $O_2^{\cdot-}$ é de grande importância para a resistência do hospedeiro a infecção pelo DENV-3.

Entretanto, mesmo o $O_2^{\cdot-}$ possuindo considerável poder antioxidante capaz de ativar ou desativar vias sensíveis de efeito redox causando dano oxidativo às células, sua toxicidade biológica é normalmente relacionada à sua capacidade de dar origem a outras espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio com maior capacidade oxidante, como ONOO⁻ (SZABÓ *et al.*, 2007). Nesse contexto, aqui nós demonstramos que após a infecção pelo DENV-3 camundongos deficientes em NOS2 tratados com apocinina apresentaram aumento das taxas de letalidade em relação a animais deficientes em NOS2 ou gp91^{phox} apenas. Além disso, muitos parâmetros da doença avaliados foram exacerbados nesses animais já no 5º dia após a infecção. Esses dados sugerem que ONOO⁻ está envolvido em parte nos efeitos protetores desencadeados pelo $O_2^{\cdot-}$ e NO gerados durante a resposta do hospedeiro à infecção pelo DENV.

Analisando nossos dados, acreditamos que de fato, esse seja um dos principais mecanismos associados à resistência do hospedeiro à infecção pelo vírus da dengue desencadeados por IFN- γ . Vários fatores sustentam essa conclusão, entre eles, o fato de animais NOS2^{-/-} tratados com Apocinina ou animais selvagens tratados com FeTPPs se comportarem de maneira muito semelhante, sucumbindo precocemente à infecção e apresentando características tão marcantes da doença já no 5º dia, o que de fato, se assemelha ao mesmo perfil observado em animais IFN- γ ^{-/-} infectados com DENV-3.

MISRA e colaboradores, (1996), foram os primeiros a relatar o possível papel de produtos nitroativos resultantes da reação com O₂⁻ na infecção pelo vírus da dengue, (MISRA *et al.*, 1996 a, b; MUKERJEE *et al.*, 1996). Os autores demonstraram que O₂⁻ e NO são induzidos pela citotoxina macrófágica (CF2) de maneira dependente de Ca²⁺ após a infecção pelo DENV, levando a morte de macrófagos infectados, sugerindo que esse processo só é possível pela geração de ONOO⁻ como produto final.

A geração dessa espécie parece ser uma “faca de dois gumes”, desencadeando efeitos benéficos ou prejudiciais ao hospedeiro durante a infecção pelo vírus da dengue (CHATURVEDI, 2009). Porém, efeitos prejudiciais ao hospedeiro são normalmente observados em altas concentrações de ONOO⁻, levando a oxidação de lipídios e DNA ou oxidação e nitração de proteínas (PACHER *et al.*, 2007), fatores que contribuem para o dano endotelial e a evolução da doença à FHD/SCD. (CHAREONSIRISUTHIGUL *et al.*, 2007; UBOL *et al.*, 2008 a, b). Além disso, a geração de espécies reativas em concentrações desnecessárias poderia acelerar o dano e morte celular induzindo maior liberação de DNA mitocondrial livre no soro, ativação de mais TLR9 e indução de todo esse processo de forma cíclica e descontrolada, o que inferimos que poderia facilitar a progressão da doença à FHD/SCD.

Entretanto, a presença de ONOO^- em baixas concentrações ou concentrações adequadas a locais específicos poderia também desempenhar um papel benéfico ao hospedeiro durante infecções por patógenos (PADALKO *et al.*, 2004). Corroborando essa afirmação, nós demonstramos neste trabalho que ONOO^- é necessário à defesa do hospedeiro contra o vírus da dengue. Nossos resultados *in vitro* sustentam essa ideia, visto que ONOO^- inibiu a replicação viral em células LLCMK2 infectadas de maneira concentração-dependente. Por outro lado, quando esses radicais livres são diminuídos, há aumento da carga viral e manifestação mais grave da doença.

O mecanismo antiviral do ONOO^- é controverso, porém seu efeito contra alguns vírus parece ser devido ao bloqueio da entrada da partícula viral nas células do hospedeiro, sendo que após a replicação em uma célula, a cópia viral de alguns enterovirus não conseguem infectar as células vizinhas com eficiência, inibindo futuras replicações (PADALKO *et al.*, 2004). É importante ressaltar que já é conhecido que o NO também é capaz de inibir a replicação viral *in vitro* (CHARNSILPA *et al.*, 2005; TAKHAMPUNYA *et al.*, 2006). Entretanto, diferentes intermediários reativos podem possuir diferentes efeitos em vários ciclos da replicação viral do mesmo vírus (KLINGSTOM *et al.*, 2006). Assim, neste trabalho inferimos que NO e ONOO^- podem atuar em diferentes partes do ciclo de replicação do vírus da dengue sendo esse processo em parte controlado pela ativação de TLR9. A ativação dessa via parece ser uma alternativa útil na prevenção da manifestação grave de doenças virais. Nesse sentido, a imunização de camundongos com CpG-DNA-lipossomal atenuou a manifestação de pneumonia grave durante a infecção pelo vírus influenza. Esses resultados somados ao conhecimento adquirido pelo nosso trabalho inferem que o mesmo efeito poderia ser também observado durante a dengue. Assim, a administração de CpG-DNA na fase

precoce da doença poderia ser utilizada como medida preventiva ao desenvolvimento da FHD/SCD. Contudo, estudos futuros devem ser feitos para averiguar essa hipótese.

Concluindo, a FIGURA 17 representa esquematicamente o que propomos neste trabalho. Neste contexto, a imunidade inata e a produção de ONOO^- exercem papéis cruciais durante a infecção pelo vírus da dengue, e receptores que reconhecem DNA, como TLR9 são essenciais para a contenção da doença. A própria ação direta do vírus ou o processo inflamatório induzido em resposta à infecção deve contribuir para a morte celular e liberação de DNA mitocondrial na circulação, que pode ser reconhecido por TLR9 (em células residentes). Esse processo parece acontecer logo ao primeiro sinal de lesão como medida de prevenção ao desenvolvimento da doença grave. Como demonstramos, a resposta imune inata dependente de TLR9 contempla fatores como a indução de $\text{IL-1}\beta$ e IFNs. Outras citocinas inflamatórias devem contribuir nesse processo (IL-12 ou IL-18) induzindo a produção de $\text{IFN-}\gamma$ (por exemplo, em células NK). Além disso, inferimos que uma “ponte” entre a imunidade inata e adaptativa inicialmente também deve ser estabelecida, culminando na indução de $\text{IFN-}\gamma$ em outros tipos celulares (por exemplo, em linfócitos TCD4^+). Além disso, demonstramos que as ações de $\text{IFN-}\gamma$ contemplam a expressão de NOS2 e $\text{gp91}^{\text{phox}}$, e consequente geração de radicais livres de oxigênio e nitrogênio que, de maneira combinada, induzem uma resposta antiviral mais efetiva pela geração de ONOO^- como produto final. Por fim, ONOO^- é capaz de inibir a replicação do vírus da dengue e sua geração é crucial à resistência do hospedeiro à infecção e contenção da doença.

Apesar do conhecimento adquirido neste trabalho, muito ainda há para se compreender sobre a imunidade inata durante a dengue experimental. Sabemos que TLR9 não é o único receptor inato capaz de reconhecer DNA mitocondrial, porém sua possível contribuição nesse processo foi amplamente discutida neste trabalho. De fato,

muitos outros receptores inatos são capazes de reconhecer produtos de morte celular e muito estudo ainda é necessário para se compreender em detalhes esse processo. Além disso, como discutido nesta tese, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem exercer efeitos benéficos ou deletérios no organismo durante a dengue, tornando o seu estudo bastante amplo e árduo. Dessa forma futuros estudos devem ser conduzidos a fim de se entender com detalhes a interação dessas espécies em períodos específicos da doença e sua contribuição à patogênese da doença/resistência. do hospedeiro à infecção.

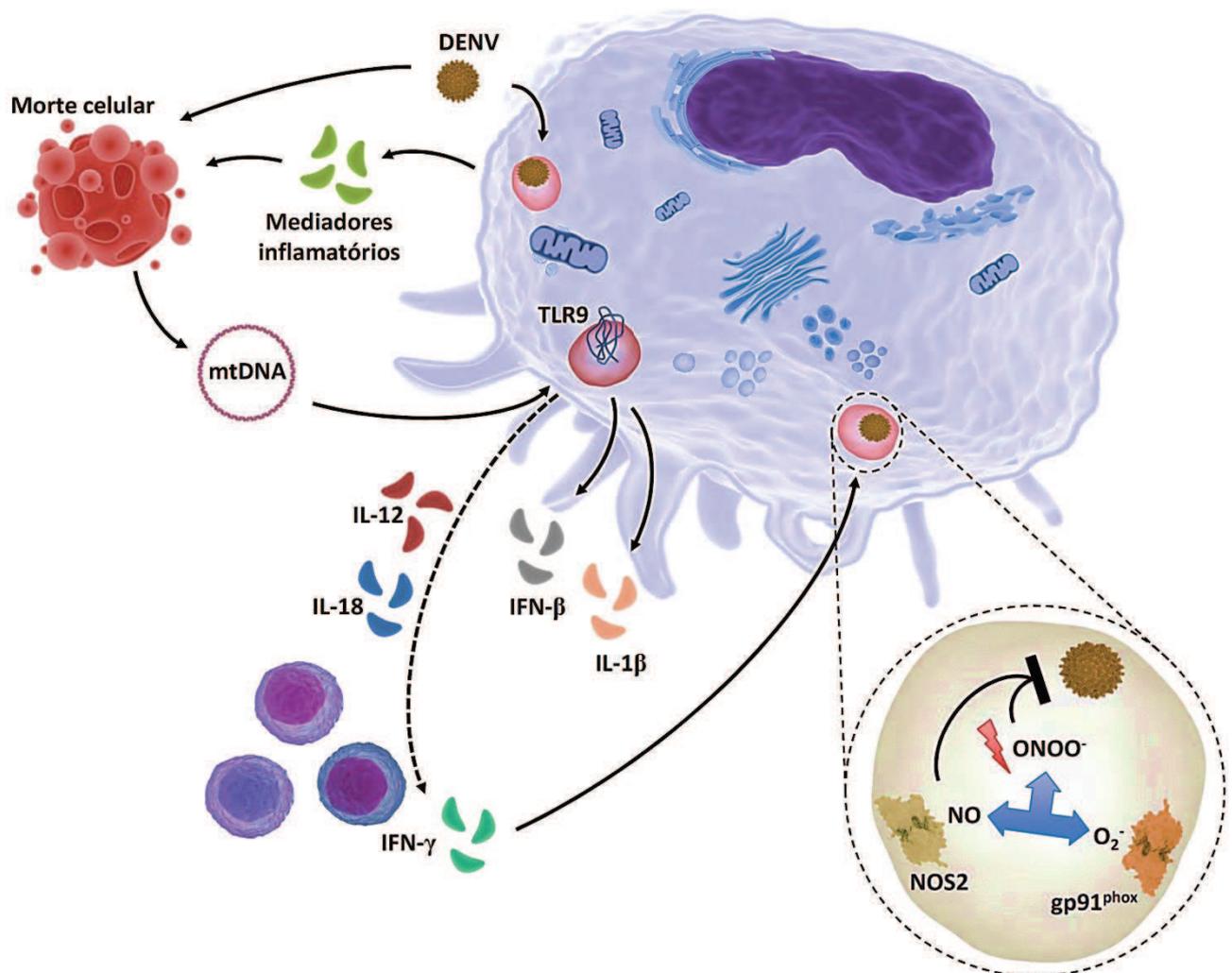


FIGURA 17: Representação esquemática dos mecanismos propostos envolvendo ativação de receptores do tipo *toll9* e formação de espécies reativas na resistência do hospedeiro à infecção pelo vírus da Dengue.

6. REFERÊNCIAS

AKIRA, S. TLR signaling. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 311, p. 1-16, 2006.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat Immunol**, v. 2, n. 8, p. 675-80, Aug 2001.

ALBIGER, B.; DAHLBERG, S.; HENRIQUES-NORMARK, B.; NORMARK, S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **J Intern Med**, v. 261, n. 6, p. 511-28, Jun 2007.

ALVES-FILHO, J. C.; SONEGO, F.; SOUTO, F. O.; FREITAS, A.; VERRI, W. A., JR.; AUXILIADORA-MARTINS, M.; BASILE-FILHO, A.; MCKENZIE, A. N.; XU, D.; CUNHA, F. Q.; LIEW, F. Y. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nat Med**, v. 16, n. 6, p. 708-12, Jun 2010.

ANDERSON, R.; WANG, S.; OSIOWY, C.; ISSEKUTZ, A. C. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. **J Virol**, v. 71, n. 6, p. 4226-32, Jun 1997.

ARANCIBIA, S. A.; BELTRAN, C. J.; AGUIRRE, I. M.; SILVA, P.; PERALTA, A. L.; MALINARICH, F.; HERMOSO, M. A. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res**, v. 40, n. 2, p. 97-112, 2007.

ATRASHEUSKAYA, A.; PETZELBAUER, P.; FREDEKING, T. M.; IGNATYEV, G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 35, n. 1, p. 33-42, Jan 21 2003.

BECKMANN, J. S.; YE, Y. Z.; ANDERSON, P. G.; CHEN, J.; ACCAVITTI, M. A.; TARPEY, M. M.; WHITE, C. R. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. **Biol Chem Hoppe Seyler**, v. 375, n. 2, p. 81-8, Feb 1994.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.;

MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr 25 2013.

BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 305-15, Mar 26 2010.

BOKISCH, V. A.; TOP, F. H., JR.; RUSSELL, P. K.; DIXON, F. J.; MULLER-EBERHARD, H. J. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. **N Engl J Med**, v. 289, n. 19, p. 996-1000, Nov 8 1973.

BOWIE, A. G. TRIM-ing down Tolls. **Nat Immunol**, v. 9, n. 4, p. 348-50, Apr 2008.

BOZZA, F. A.; CRUZ, O. G.; ZAGNE, S. M.; AZEREDO, E. L.; NOGUEIRA, R. M.; ASSIS, E. F.; BOZZA, P. T.; KUBELKA, C. F. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infect Dis**, v. 8, p. 86, 2008.

BRASIER, A. R.; JU, H.; GARCIA, J.; SPRATT, H. M.; VICTOR, S. S.; FORSHEY, B. M.; HALSEY, E. S.; COMACH, G.; SIERRA, G.; BLAIR, P. J.; ROCHA, C.; MORRISON, A. C.; SCOTT, T. W.; BAZAN, I.; KOCHER, T. J. A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 2, p. 341-8, Feb 2012.

BRESSANELLI, S.; STIASNY, K.; ALLISON, S. L.; STURA, E. A.; DUQUERROY, S.; LESCAR, J.; HEINZ, F. X.; REY, F. A. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. **EMBO J**, v. 23, n. 4, p. 728-38, Feb 25 2004.

BYLUND, J.; BROWN, K. L.; MOVITZ, C.; DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 12, p. 1834-45, Dec 15 2010.

CAMBRIDGE PRESS: Disponível em:
<http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_06/S1462399403005908sup004.htm>. Acesso em 23 mar 2013.

CHAKRABORTI, S.; MANDAL, A.; DAS, S.; CHAKRABORTI, T. Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchanger by peroxynitrite in microsomes of pulmonary smooth muscle: role of matrix metalloproteinase-2. **Biochim Biophys Acta**, v. 1671, n. 1-3, p. 70-8, Mar 17 2004.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KALAYANAROOJ, S.; UBOL, S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 2, p. 365-75, Feb 2007.

CHARNSILPA, W.; TAKHAMPUNYA, R.; ENDY, T. P.; MAMMEN, M. P., JR.; LIBRATY, D. H.; UBOL, S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. **J Med Virol**, v. 77, n. 1, p. 89-95, Sep 2005.

CHATURVEDI, U.; NAGAR, R.; SHRIVASTAVA, R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 47, n. 2, p. 155-66, Jul 2006.

CHATURVEDI, U. C.; AGARWAL, R.; ELBISHBISHI, E. A.; MUSTAFA, A. S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 28, n. 3, p. 183-8, Jul 2000.

CHATURVEDI, U. C.; ELBISHBISHI, E. A.; AGARWAL, R.; RAGHUPATHY, R.; NAGAR, R.; TANDON, R.; PACSA, A. S.; YOUNIS, O. I.; AZIZIEH, F. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. **J Med Virol**, v. 59, n. 3, p. 335-40, Nov 1999.

CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 56, n. 1, p. 9-24, Jun

2009.

CHEN, J. P.; LU, H. L.; LAI, S. L.; CAMPANELLA, G. S.; SUNG, J. M.; LU, M. Y.; WU-HSIEH, B. A.; LIN, Y. L.; LANE, T. E.; LUSTER, A. D.; LIAO, F. Dengue virus induces expression of CXC chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate. **J Immunol**, v. 177, n. 5, p. 3185-92, Sep 1 2006.

CHEN, L. C.; LEI, H. Y.; LIU, C. C.; SHIESH, S. C.; CHEN, S. H.; LIU, H. S.; LIN, Y. S.; WANG, S. T.; SHYU, H. W.; YEH, T. M. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, n. 1, p. 142-7, Jan 2006.

CHIEN, L. J.; LIAO, T. L.; SHU, P. Y.; HUANG, J. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 4, p. 1295-304, Apr 2006.

CHOI, J.; LEE, K. J.; ZHENG, Y.; YAMAGA, A. K.; LAI, M. M.; OU, J. H. Reactive oxygen species suppress hepatitis C virus RNA replication in human hepatoma cells. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 81-9, Jan 2004.

CLAVREUL, N.; ADACHI, T.; PIMENTAL, D. R.; IDO, Y.; SCHONEICH, C.; COHEN, R. A. S-glutathiolation by peroxynitrite of p21ras at cysteine-118 mediates its direct activation and downstream signaling in endothelial cells. **FASEB J**, v. 20, n. 3, p. 518-20, Mar 2006.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol**, v. 80, n. 23, p. 11418-31, Dec 2006.

COSSARIZZA, A.; PINTI, M.; NASI, M.; GIBELLINI, L.; MANZINI, S.; ROAT, E.; DE BIASI, S.; BERTONCELLI, L.; MONTAGNA, J. P.; BISI, L.; MANZINI, L.; TRENTI, T.; BORGHI, V.; MUSSINI, C. Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for mitochondrial damage-

associated molecular patterns during inflammation. **Mitochondrion**, v. 11, n. 5, p. 750-5, Sep 2011.

COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. **Am J Pathol**, v. 182, n. 6, p. 1950-61, Jun 2013.

COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T.; VALADAO, D. F.; CISALPINO, D.; DIAS, A. C.; SILVEIRA, K. D.; KANGUSSU, L. M.; AVILA, T. V.; BONFIM, M. R.; BONAVENTURA, D.; SILVA, T. A.; SOUSA, L. P.; RACHID, M. A.; VIEIRA, L. Q.; MENEZES, G. B.; DE PAULA, A. M.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN-gamma in host resistance to infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1663, 2012.

DAVIS, C. N.; MANN, E.; BEHRENS, M. M.; GAIDAROVA, S.; REBEK, M.; REBEK, J., JR.; BARTFAI, T. MyD88-dependent and -independent signaling by IL-1 in neurons probed by bifunctional Toll/IL-1 receptor domain/BB-loop mimetics. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 8, p. 2953-8, Feb 21 2006.

DECKER, T.; STOCKINGER, S.; KARAGHIOSOFF, M.; MULLER, M.; KOVARIK, P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. **J Clin Invest**, v. 109, n. 10, p. 1271-7, May 2002.

DEJNIRATTISAI, W.; JUMNAINSONG, A.; ONSIRISAKUL, N.; FITTON, P.; VASANAWATHANA, S.; LIMPITIKUL, W.; PUTTIKHUNT, C.; EDWARDS, C.; DUANGCHINDA, T.; SUPASA, S.; CHAWANSUNTATI, K.; MALASIT, P.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 745-8, May 7 2010.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

EDWARDS, L.; WILLIAMS, A. E.; KRIEG, A. M.; RAE, A. J.; SNELGROVE, R. J.; HUSSELL, T. Stimulation via Toll-like receptor 9 reduces *Cryptococcus neoformans*-

induced pulmonary inflammation in an IL-12-dependent manner. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 1, p. 273-81, Jan 2005.

FAGUNDES, C. T.; COSTA, V. V.; CISALPINO, D.; AMARAL, F. A.; SOUZA, P. R.; SOUZA, R. S.; RYFFEL, B.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, T. A.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; SOUSA, L. P.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. IFN-gamma production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 12, p. e1449, Dec 2011.

FANG, S.; WU, Y.; WU, N.; ZHANG, J.; AN, J. Recent advances in DENV receptors. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 684690, 2013.

FANTUZZI, G.; REED, D. A.; DINARELLO, C. A. IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. **J Clin Invest**, v. 104, n. 6, p. 761-7, Sep 1999.

GARCIA, C. C.; RUSSO, R. C.; GUABIRABA, R.; FAGUNDES, C. T.; POLIDORO, R. B.; TAVARES, L. P.; SALGADO, A. P.; CASSALI, G. D.; SOUSA, L. P.; MACHADO, A. V.; TEIXEIRA, M. M. Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by Influenza A in mice. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 11, p. e1001171, 2010.

GARCIA, X.; STEIN, F. Nitric oxide. **Semin Pediatr Infect Dis**, v. 17, n. 2, p. 55-7, Apr 2006.

GOLDMAN, M. Translational mini-review series on Toll-like receptors: Toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 2, p. 208-16, Feb 2007.

GOUGH, D. J.; LEVY, D. E.; JOHNSTONE, R. W.; CLARKE, C. J. IFN-gamma signaling-does it mean JAK-STAT? **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 19, n. 5-6, p. 383-94, Oct-Dec 2008.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue

hemorrhagic fever. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, n. 5, p. 429-36, Oct 2006.

GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; NISALAK, A.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. **J Med Virol**, v. 59, n. 3, p. 329-34, Nov 1999.

GROVER, A. K.; KWAN, C. Y.; SAMSON, S. E. Effects of peroxynitrite on sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump isoforms SERCA2b and SERCA3a. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 285, n. 6, p. C1537-43, Dec 2003.

GUABIRABA, R.; BESNARD, A. G.; MARQUES, R. E.; MAILLET, I.; FAGUNDES, C. T.; CONCEICAO, T. M.; RUST, N. M.; CHARREAU, S.; PARIS, I.; LECRON, J. C.; RENAULD, J. C.; QUESNIAUX, V.; DA POIAN, A. T.; ARRUDA, L. B.; SOUZA, D. G.; RYFFEL, B.; TEIXEIRA, M. M. IL-22 modulates IL-17A production and controls inflammation and tissue damage in experimental dengue infection. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 6, p. 1529-44, Jun 2013.

GUABIRABA, R.; MARQUES, R. E.; BESNARD, A. G.; FAGUNDES, C. T.; SOUZA, D. G.; RYFFEL, B.; TEIXEIRA, M. M. Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15680, 2010.

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

GUBLER, D. J.; REED, D.; ROSEN, L.; HITCHCOCK, J. R., JR. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. **Am J Trop Med Hyg**, v. 27, n. 3, p. 581-9, May 1978.

GUERRERO, C. D.; ARRIETA, A. F.; RAMIREZ, N. D.; RODRIGUEZ, L. S.; VEGA, R.; BOSCH, I.; RODRIGUEZ, J. A.; NARVAEZ, C. F.; SALGADO, D. M. High plasma levels of soluble ST2 but not its ligand IL-33 is associated with severe forms of pediatric dengue. **Cytokine**, v. 61, n. 3, p. 766-71, Mar 2013.

GUTIERREZ-MARTIN, Y.; MARTIN-ROMERO, F. J.; HENAO, F.; GUTIERREZ-MERINO, C. Alteration of cytosolic free calcium homeostasis by SIN-1: high sensitivity of L-type Ca²⁺ channels to extracellular oxidative/nitrosative stress in cerebellar granule cells. **J Neurochem**, v. 92, n. 4, p. 973-89, Feb 2005.

GUZMAN, A.; ISTURIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36 Suppl 1, p. S40-2, Nov 2010.

GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Arch Virol**, v. 158, n. 7, p. 1445-59, Jul 2013.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTINEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, Dec 2010.

GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Viruses**, v. 2, n. 12, p. 2649-62, Dec 2010.

HA, T. T.; HUY, N. T.; MURAO, L. A.; LAN, N. T.; THUY, T. T.; TUAN, H. M.; NGA, C. T.; TUONG, V. V.; DAT, T. V.; KIKUCHI, M.; YASUNAMI, M.; MORITA, K.; HUONG, V. T.; HIRAYAMA, K. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25969, 2011.

HAEBERLEIN, S.; SEBALD, H.; BOGDAN, C.; SCHLEICHER, U. IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by *Leishmania infantum* in vivo. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 6, p. 1708-17, Jun 2010.

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

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

HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv Virus Res**, v. 60, p. 421-67, 2003.

HALSTEAD, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. **Annu Rev Entomol**, v. 53, p. 273-91, 2008.

HATTORI, M.; TATEYAMA, M.; OISHI, T.; MIYASAKA, S.; FUKUTAKE, K. [Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors as markers for disease progression of human immunodeficiency virus infection]. **Rinsho Byori**, v. 45, n. 11, p. 1085-90, Nov 1997.

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

HENNESSY, E. J.; PARKER, A. E.; O'NEILL, L. A. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 4, p. 293-307, Apr 2010.

HO, L. J.; SHAIQ, M. F.; CHANG, D. M.; LIAO, C. L.; LAI, J. H. Infection of human dendritic cells by dengue virus activates and primes T cells towards Th0-like phenotype producing both Th1 and Th2 cytokines. **Immunol Invest**, v. 33, n. 4, p. 423-37, 2004.

HOBER, D.; DELANNOY, A. S.; BENYOUCEF, S.; DE GROOTE, D.; WATTRE, P. High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengue-infected patients. **Microbiol Immunol**, v. 40, n. 8, p. 569-73, 1996.

HOBER, D.; POLI, L.; ROBLIN, B.; GESTAS, P.; CHUNGUE, E.; GRANIC, G.; IMBERT, P.; PECARERE, J. L.; VERGEZ-PASCAL, R.; WATTRE, P.; ET AL. 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**, v. 48,

n. 3, p. 324-31, Mar 1993.

HOBBER, D.; SHEN, L.; BENYOUCEF, S.; DE GROOTE, D.; DEUBEL, V.; WATTRE, P. Enhanced TNF alpha production by monocytic-like cells exposed to dengue virus antigens. **Immunol Lett**, v. 53, n. 2-3, p. 115-20, Nov 1996.

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

HONDA, K.; TANIGUCHI, T. Toll-like receptor signaling and IRF transcription factors. **IUBMB Life**, v. 58, n. 5-6, p. 290-5, May-Jun 2006.

HUANG, H.; EVANKOVICH, J.; YAN, W.; NACE, G.; ZHANG, L.; ROSS, M.; LIAO, X.; BILLIAR, T.; XU, J.; ESMON, C. T.; TSUNG, A. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. **Hepatology**, v. 54, n. 3, p. 999-1008, Sep 2 2011.

HUANG, X.; BARRETT, R. P.; MCCLELLAN, S. A.; HAZLETT, L. D. Silencing Toll-like receptor-9 in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 46, n. 11, p. 4209-16, Nov 2005.

HUANG, Y. H.; LIU, C. C.; WANG, S. T.; LEI, H. Y.; LIU, H. L.; LIN, Y. S.; WU, H. L.; YEH, T. M. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. **J Med Virol**, v. 63, n. 3, p. 247-51, Mar 2001.

ICTV Virus Taxonomy: 2012 Release (current): Disponível em <<http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp?version=2012>>. Acesso em: 23 mar 2013

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol**, v. 5, n. 10, p. 987-95, Oct 2004.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**, v. 327, n. 5963, p. 291-5, Jan 15 2010.

JAESCHKE, H. Chemokines, neutrophils, and inflammatory liver injury. **Shock**, v. 6, n. 6, p. 403-4, Dec 1996.

JANG, B.; HAN, S. Biochemical properties of cytochrome c nitrated by peroxynitrite. **Biochimie**, v. 88, n. 1, p. 53-8, Jan 2006.

KAKAR, R.; KAUTZ, B.; EKLUND, E. A. JAK2 is necessary and sufficient for interferon-gamma-induced transcription of the gene encoding gp91PHOX. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 1, p. 120-7, Jan 2005.

KALAYANAROOJ, S.; VAUGHN, D. W.; NIMMANNITYA, S.; GREEN, S.; SUNTAYAKORN, S.; KUNENTRASAI, N.; VIRAMITRACHAI, W.; RATANACHU-EKE, S.; KIATPOLPOJ, S.; INNIS, B. L.; ROTHMAN, A. L.; NISALAK, A.; ENNIS, F. A. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. **J Infect Dis**, v. 176, n. 2, p. 313-21, Aug 1997.

KAREHED, K.; DIMBERG, A.; DAHL, S.; NILSSON, K.; OBERG, F. IFN-gamma-induced upregulation of Fcgamma-receptor-I during activation of monocytic cells requires the PKR and NFkappaB pathways. **Mol Immunol**, v. 44, n. 4, p. 615-24, Jan 2007.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-50, May 27 2011.

KENNY, E. F.; O'NEILL, L. A. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 342-9, Sep 2008.

KING, A. D.; NISALAK, A.; KALAYANROOJ, S.; MYINT, K. S.; PATTANAPANYASAT, K.; NIMMANNITYA, S.; INNIS, B. L. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 30, n. 4, p. 718-28, Dec 1999.

KLINGSTROM, J.; AKERSTROM, S.; HARDESTAM, J.; STOLTZ, M.; SIMON, M.; FALK, K. I.; MIRAZIMI, A.; ROTTENBERG, M.; LUNDKVIST, A. Nitric oxide and peroxynitrite have different antiviral effects against hantavirus replication and free

mature virions. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 10, p. 2649-57, Oct 2006.

KRISHNAN, M. N.; SUKUMARAN, B.; PAL, U.; AGAISSE, H.; MURRAY, J. L.; HODGE, T. W.; FIKRIG, E. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. **J Virol**, v. 81, n. 9, p. 4881-5, May 2007.

KUO, C. H.; TAI, D. I.; CHANG-CHIEN, C. S.; LAN, C. K.; CHIOU, S. S.; LIAW, Y. F. Liver biochemical tests and dengue fever. **Am J Trop Med Hyg**, v. 47, n. 3, p. 265-70, Sep 1992.

KURANE, I.; ROTHMAN, A. L.; LIVINGSTON, P. G.; GREEN, S.; GAGNON, S. J.; JANUS, J.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A.; ENNIS, F. A. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. **Arch Virol Suppl**, v. 9, p. 59-64, 1994.

KYLE, J. L.; BALSITIS, S. J.; ZHANG, L.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. **Virology**, v. 380, n. 2, p. 296-303, Oct 25 2008.

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

LAUZON, N. M.; MIAN, F.; MACKENZIE, R.; ASHKAR, A. A. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. **Cell Immunol**, v. 241, n. 2, p. 102-12, Jun 2006.

LEE, N.; WONG, C. K.; CHAN, P. K.; CHAN, M. C.; WONG, R. Y.; LUN, S. W.; NGAI, K. L.; LUI, G. C.; WONG, B. C.; LEE, S. K.; CHOI, K. W.; HUI, D. S. Cytokine response patterns in severe pandemic 2009 H1N1 and seasonal influenza among hospitalized adults. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26050, 2011.

LEE, Y. R.; LIU, M. T.; LEI, H. Y.; LIU, C. C.; WU, J. M.; TUNG, Y. C.; LIN, Y. S.; YE, T. M.; CHEN, S. H.; LIU, H. S. 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**, v. 87, n. Pt 12, p. 3623-30, Dec 2006.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973-83, Sep 20 1996.

LIANG, Z.; WU, S.; LI, Y.; HE, L.; WU, M.; JIANG, L.; FENG, L.; ZHANG, P.; HUANG, X. Activation of Toll-like receptor 3 impairs the dengue virus serotype 2 replication through induction of IFN-beta in cultured hepatoma cells. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23346, 2011.

LIBRATY, D. H.; YOUNG, P. R.; PICKERING, D.; ENDY, T. P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, v. 186, n. 8, p. 1165-8, Oct 15 2002.

LIN, C. F.; LEI, H. Y.; SHIAU, A. L.; LIU, H. S.; YEH, T. M.; CHEN, S. H.; LIU, C. C.; CHIU, S. C.; LIN, Y. S. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. **J Immunol**, v. 169, n. 2, p. 657-64, Jul 15 2002.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **J Virol**, v. 73, n. 6, p. 4611-21, Jun 1999.

LIU, T.; CASTRO, S.; BRASIER, A. R.; JAMALUDDIN, M.; GAROFALO, R. P.; CASOLA, A. Reactive oxygen species mediate virus-induced STAT activation: role of tyrosine phosphatases. **J Biol Chem**, v. 279, n. 4, p. 2461-9, Jan 23 2004.

LOZACH, P. Y.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SANCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J. L.; REY, F. A.; DESPRES, P.; ARENZANA-

SEISDEDOS, F.; AMARA, A. 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**, v. 280, n. 25, p. 23698-708, Jun 24 2005.

LUDEWIG, B.; GRAF, D.; GELDERBLOM, H. R.; BECKER, Y.; KROCZEK, R. A.; PAULI, G. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 7, p. 1943-50, Jul 1995.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 323-50, 1997.

MAIRUHU, A. T.; PERI, G.; SETIATI, T. E.; HACK, C. E.; KORAKA, P.; SOEMANTRI, A.; OSTERHAUS, A. D.; BRANDJES, D. P.; VAN DER MEER, J. W.; MANTOVANI, A.; VAN GORP, E. C. Elevated plasma levels of the long pentraxin, pentraxin 3, in severe dengue virus infections. **J Med Virol**, v. 76, n. 4, p. 547-52, Aug 2005.

MALASIT, P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 18, n. 3, p. 316-20, Sep 1987.

MALAVIGE, G. N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D. J.; SENEVIRATNE, S. L. Dengue viral infections. **Postgrad Med J**, v. 80, n. 948, p. 588-601, Oct 2004.

MANEEKAN, P.; LEAUNGWUTIWONG, P.; MISSE, D.; LUPLERTLOP, N. T helper (Th) 1 and Th2 cytokine expression profile in dengue and malaria infection using magnetic bead-based bio-plex assay. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 44, n. 1, p. 31-6, Jan 2013.

MANGADA, M. M.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. Quantitation of dengue virus specific CD4+ T cells by intracellular cytokine staining. **J Immunol Methods**, v. 284, n. 1-2, p. 89-97, Jan 2004.

MARQUES, P. E.; AMARAL, S. S.; PIRES, D. A.; NOGUEIRA, L. L.; SORIANI, F.

M.; LIMA, B. H.; LOPES, G. A.; RUSSO, R. C.; AVILA, T. V.; MELGACO, J. G.; OLIVEIRA, A. G.; PINTO, M. A.; LIMA, C. X.; DE PAULA, A. M.; CARA, D. C.; LEITE, M. F.; TEIXEIRA, M. M.; MENEZES, G. B. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. **Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1971-82, Nov 2012.

MATATA, B. M.; GALINANES, M. Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity. **J Biol Chem**, v. 277, n. 3, p. 2330-5, Jan 18 2002.

MATOS, I. M.; SOUZA, D. G.; SEABRA, D. G.; FREIRE-MAIA, L.; TEIXEIRA, M. M. Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 376, n. 3, p. 293-300, Jul 9 1999.

MATSUDA, T.; ALMASAN, A.; TOMITA, M.; TAMAKI, K.; SAITO, M.; TADANO, M.; YAGITA, H.; OHTA, T.; MORI, N. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 4, p. 1055-65, Apr 2005.

MAZZI, P.; DONINI, M.; MARGOTTO, D.; WIENTJES, F.; DUSI, S. IFN-gamma induces gp91phox expression in human monocytes via protein kinase C-dependent phosphorylation of PU.1. **J Immunol**, v. 172, n. 8, p. 4941-7, Apr 15 2004.

MCDONALD, B.; KUBES, P. Neutrophils and intravascular immunity in the liver during infection and sterile inflammation. **Toxicol Pathol**, v. 40, n. 2, p. 157-65, 2012.

MCGILL, M. R.; WILLIAMS, C. D.; XIE, Y.; RAMACHANDRAN, A.; JAESCHKE, H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 264, n. 3, p. 387-94, Nov 1 2012.

MEDIN, C. L.; FITZGERALD, K. A.; ROTHMAN, A. L. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. **J Virol**, v. 79, n. 17, p.

11053-61, Sep 2005.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-7, Jul 24 1997.

MILLER, J. L.; DE WET, B. J.; MARTINEZ-POMARES, L.; RADCLIFFE, C. M.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M.; GORDON, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, p. e17, Feb 8 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Disponível em <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em 23 mar 2013

MISRA, A.; MUKERJEE, R.; CHATURVEDI, U. C. Production of nitrite by dengue virus-induced cytotoxic factor. **Clin Exp Immunol**, v. 104, n. 3, p. 406-11, Jun 1996.

MISRA, A.; MUKERJEE, R.; CHATURVEDI, U. C. Release of reactive oxygen intermediates by dengue virus-induced macrophage cytotoxin. **Int J Exp Pathol**, v. 77, n. 5, p. 237-42, Oct 1996.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-9, Jan 22 2004.

MOLNAR, R. G.; WANG, P.; AYALA, A.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A.; CHAUDRY, I. H. The role of neutrophils in producing hepatocellular dysfunction during the hyperdynamic stage of sepsis in rats. **J Surg Res**, v. 73, n. 2, p. 117-22, Dec 1997.

MORENO, J. J.; PRYOR, W. A. Inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. **Chem Res Toxicol**, v. 5, n. 3, p. 425-31, May-Jun 1992.

MORIWAKI, K.; KIYOMOTO, H.; HITOMI, H.; IHARA, G.; KAIFU, K.; MATSUBARA, K.; HARA, T.; KONDO, N.; OHMORI, K.; NISHIYAMA, A.;

FUKUI, T.; KOHNO, M. Interferon-gamma enhances superoxide production in human mesangial cells via the JAK-STAT pathway. **Kidney Int**, v. 70, n. 4, p. 788-93, Aug 2006.

MUKERJEE, R.; MISRA, A.; CHATURVEDI, U. C. Dengue virus-induced cytotoxin releases nitrite by spleen cells. **Int J Exp Pathol**, v. 77, n. 2, p. 45-51, Apr 1996.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 1, p. 13-22, Jan 2005.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 587-619, 2011.

MUSTAFA, A. S.; ELBISHBISHI, E. A.; AGARWAL, R.; CHATURVEDI, U. C. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 30, n. 3, p. 229-33, Apr 2001.

NARAYANAN, M.; ARAVIND, M. A.; THILOTHAMMAL, N.; PREMA, R.; SARGUNAM, C. S.; RAMAMURTY, N. Dengue fever epidemic in Chennai--a study of clinical profile and outcome. **Indian Pediatr**, v. 39, n. 11, p. 1027-33, Nov 2002.

NASIRUDEEN, A. M.; WONG, H. H.; THIEN, P.; XU, S.; LAM, K. P.; LIU, D. X. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 1, p. e926, 2011.

NAVARRO-SANCHEZ, E.; DESPRES, P.; CEDILLO-BARRON, L. Innate immune responses to dengue virus. **Arch Med Res**, v. 36, n. 5, p. 425-35, Sep-Oct 2005.

NEVES-SOUZA, P. C.; AZEREDO, E. L.; ZAGNE, S. M.; VALLS-DE-SOUZA, R.; REIS, S. R.; CERQUEIRA, D. I.; NOGUEIRA, R. M.; KUBELKA, C. F. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. **BMC Infect Dis**, v. 5, p. 64, 2005.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007.

PACSA, A. S.; AGARWAL, R.; ELBISHBISHI, E. A.; CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R.; MUSTAFA, A. S. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 28, n. 2, p. 151-5, Jun 2000.

PADALKO, E.; OHNISHI, T.; MATSUSHITA, K.; SUN, H.; FOX-TALBOT, K.; BAO, C.; BALDWIN, W. M., 3RD; LOWENSTEIN, C. J. Peroxynitrite inhibition of Coxsackievirus infection by prevention of viral RNA entry. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 32, p. 11731-6, Aug 10 2004.

PAES, M. V.; LENZI, H. L.; NOGUEIRA, A. C.; NUOVO, G. J.; PINHAO, A. T.; MOTA, E. M.; BASILIO-DE-OLIVEIRA, C. A.; SCHATZMAYR, H.; BARTH, O. M.; ALVES, A. M. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. **Lab Invest**, v. 89, n. 10, p. 1140-51, Oct 2009.

PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 1, p. 43-5, Jan 2007.

PAPACHRISTOU, G. I.; WHITCOMB, D. C. Predictors of severity and necrosis in acute pancreatitis. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 33, n. 4, p. 871-90, Dec 2004.

PARKASH, O.; ALMAS, A.; JAFRI, S. M.; HAMID, S.; AKHTAR, J.; ALISHAH, H. Severity of acute hepatitis and its outcome in patients with dengue fever in a tertiary care hospital Karachi, Pakistan (South Asia). **BMC Gastroenterol**, v. 10, p. 43, 2010.

PARKER, L. C.; PRINCE, L. R.; SABROE, I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 2, p. 199-207, Feb 2007.

PEARL-YAFE, M.; HALPERIN, D.; HALEVY, A.; KALIR, H.; BIELORAI, B.; FABIAN, I. An oxidative mechanism of interferon induced priming of the Fas pathway in Fanconi anemia cells. **Biochem Pharmacol**, v. 65, n. 5, p. 833-42, Mar 1 2003.

PEELING, R. W.; ARTSOB, H.; PELEGRINO, J. L.; BUCHY, P.; CARDOSA, M. J.; DEVI, S.; ENRIA, D. A.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; HUNSPERGER, E.; KLIKS, S.; MARGOLIS, H. S.; NATHANSON, C. M.; NGUYEN, V. C.; RIZZO, N.; VAZQUEZ, S.; YOKSAN, S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S30-8, Dec 2010.

PINTO, L. M.; OLIVEIRA, S. A.; BRAGA, E. L.; NOGUEIRA, R. M.; KUBELKA, C. F. Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 387-94, May-Jun 1999.

PLATT, D. H.; BARTOLI, M.; EL-REMESSY, A. B.; AL-SHABRAWAY, M.; LEMTALSI, T.; FULTON, D.; CALDWELL, R. B. Peroxynitrite increases VEGF expression in vascular endothelial cells via STAT3. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 10, p. 1353-61, Nov 15 2005.

PRYOR, W. A.; SQUADRITO, G. L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **Am J Physiol**, v. 268, n. 5 Pt 1, p. L699-722, May 1995.

PUDDU, P.; FANTUZZI, L.; BORGHI, P.; VARANO, B.; RAINALDI, G.; GUILLEMARD, E.; MALORNI, W.; NICAISE, P.; WOLF, S. F.; BELARDELLI, F.; GESSANI, S. IL-12 induces IFN-gamma expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. **J Immunol**, v. 159, n. 7, p. 3490-7, Oct 1 1997.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 849-63, Feb 24 2006.

RADI, R.; CASSINA, A.; HODARA, R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. **Biol Chem**, v. 383, n. 3-4, p. 401-9, Mar-Apr 2002.

RADI, R.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; NAVILIAT, M.; CAYOTA, A.

Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 5, p. 463-88, Mar 1 2001.

RADI, R.; RODRIGUEZ, M.; CASTRO, L.; TELLERI, R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. **Arch Biochem Biophys**, v. 308, n. 1, p. 89-95, Jan 1994.

RAGHUPATHY, R.; CHATURVEDI, U. C.; AL-SAYER, H.; ELBISHBISHI, E. A.; AGARWAL, R.; NAGAR, R.; KAPOOR, S.; MISRA, A.; MATHUR, A.; NUSRAT, H.; AZIZIEH, F.; KHAN, M. A.; MUSTAFA, A. S. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. **J Med Virol**, v. 56, n. 3, p. 280-5, Nov 1998.

RATHAKRISHNAN, A.; WANG, S. M.; HU, Y.; KHAN, A. M.; PONNAMPALAVANAR, S.; LUM, L. C.; MANIKAM, R.; SEKARAN, S. D. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52215, 2012.

RENNESON, J.; GUABIRABA, R.; MAILLET, I.; MARQUES, R. E.; IVANOV, S.; FONTAINE, J.; PAGET, C.; QUESNIAUX, V.; FAVEEUW, C.; RYFFEL, B.; TEIXEIRA, M. M.; TROTTEIN, F. A detrimental role for invariant natural killer T cells in the pathogenesis of experimental dengue virus infection. **Am J Pathol**, v. 179, n. 4, p. 1872-83, Oct 2011.

RHODES, A.; WORT, S. J.; THOMAS, H.; COLLINSON, P.; BENNETT, E. D. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. **Crit Care**, v. 10, n. 2, p. R60, 2006.

RIVINO, L.; KUMARAN, E. A.; JOVANOVIĆ, V.; NADUA, K.; TEO, E. W.; PANG, S. W.; TEO, G. H.; GAN, V. C.; LYE, D. C.; LEO, Y. S.; HANSON, B. J.; SMITH, K. G.; BERTOLETTI, A.; KEMENY, D. M.; MACARY, P. A. Differential targeting of viral components by CD4⁺ versus CD8⁺ T lymphocytes in dengue virus infection. **J Virol**, v. 87, n. 5, p. 2693-706, Mar 2013.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R.; BELICHA-VILLANUEVA, A.; BERNAL-RUBIO, D.;

ASHOUR, J.; AYLLON, J.; FERNANDEZ-SESMA, A. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. **J Virol**, v. 84, n. 19, p. 9760-74, Oct 2010.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R.; BERNAL-RUBIO, D.; KAMINSKI, D.; BOYD, K.; FERNANDEZ-SESMA, A. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. **J Virol**, v. 84, n. 9, p. 4845-50, May 2010.

ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg**, v. 26, n. 3, p. 337-43, May 1977.

ROTHMAN, A. L. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. **Adv Virus Res**, v. 60, p. 397-419, 2003.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **J Clin Invest**, v. 113, n. 7, p. 946-51, Apr 2004.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 532-43, Aug 2011.

SALGO, M. G.; SQUADRITO, G. L.; PRYOR, W. A. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 215, n. 3, p. 1111-8, Oct 24 1995.

SAMUEL, C. E.; OZATO, K. Induction of interferons-induced genes. **Biotherapy**, v. 8, n. 3-4, p. 183-7, 1996.

SASAI, M.; TATEMATSU, M.; OSHIUMI, H.; FUNAMI, K.; MATSUMOTO, M.; HATAKEYAMA, S.; SEYA, T. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. **Mol Immunol**, v. 47, n. 6, p. 1283-91, Mar 2010.

SASAKI, H.; BALTO, K.; KAWASHIMA, N.; EASTCOTT, J.; HOSHINO, K.; AKIRA, S.; STASHENKO, P. Gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-

stimulated bone resorption in vivo. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 1, p. 106-10, Jan 2004.

SASAKI, M.; IKEDA, H.; SATO, Y.; NAKANUMA, Y. Proinflammatory cytokine-induced cellular senescence of biliary epithelial cells is mediated via oxidative stress and activation of ATM pathway: a culture study. **Free Radic Res**, v. 42, n. 7, p. 625-32, Jul 2008.

SCHMIDT, A. C. Response to dengue fever--the good, the bad, and the ugly? **N Engl J Med**, v. 363, n. 5, p. 484-7, Jul 29 2010.

SCHRODER, N. W.; HEINE, H.; ALEXANDER, C.; MANUKYAN, M.; ECKERT, J.; HAMANN, L.; GOBEL, U. B.; SCHUMANN, R. R. Lipopolysaccharide binding protein binds to triacylated and diacylated lipopeptides and mediates innate immune responses. **J Immunol**, v. 173, n. 4, p. 2683-91, Aug 15 2004.

SCOTT, R. M.; NISALAK, A.; CHEAMUDON, U.; SERIDHORANAKUL, S.; NIMMANNITYA, S. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, v. 141, n. 1, p. 1-6, Jan 1980.

SEIFERT, U.; BIALY, L. P.; EBSTEIN, F.; BECH-OTSCHIR, D.; VOIGT, A.; SCHROTER, F.; PROZOROVSKI, T.; LANGE, N.; STEFFEN, J.; RIEGER, M.; KUCKELKORN, U.; AKTAS, O.; KLOETZEL, P. M.; KRUGER, E. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. **Cell**, v. 142, n. 4, p. 613-24, Aug 20 2010.

SEN, G. C. Viruses and interferons. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 255-81, 2001.

SHEPARD, D. S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y. A.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. H. Economic impact of dengue illness in the Americas. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, n. 2, p. 200-7, Feb 2011.

SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A. Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 2, p. e2055, 2013.

SHRESTA, S.; KYLE, J. L.; ROBERT BEATTY, P.; HARRIS, E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. **Virology**, v. 319, n. 2, p. 262-73, Feb 20 2004.

SHRESTA, S.; KYLE, J. L.; SNIDER, H. M.; BASAVAPATNA, M.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **J Virol**, v. 78, n. 6, p. 2701-10, Mar 2004.

SHRESTA, S.; SHARAR, K. L.; PRIGOZHIN, D. M.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. **J Virol**, v. 80, n. 20, p. 10208-17, Oct 2006.

SINGHI, S.; JAYASHREE, M. Dengue shock syndrome: at the heart of the issue. **Pediatr Crit Care Med**, v. 8, n. 6, p. 583-4, Nov 2007.

SOHN, H. Y.; KROTZ, F.; ZAHLER, S.; GLOE, T.; KELLER, M.; THEISEN, K.; SCHIELE, T. M.; KLAUSS, V.; POHL, U. Crucial role of local peroxynitrite formation in neutrophil-induced endothelial cell activation. **Cardiovasc Res**, v. 57, n. 3, p. 804-15, Mar 2003.

SOUZA, D. G.; FAGUNDES, C. T.; SOUSA, L. P.; AMARAL, F. A.; SOUZA, R. S.; SOUZA, A. L.; KROON, E. G.; SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; BUKIN, E.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M. M. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 33, p. 14138-43, Aug 18 2009.

SOUZA, L. J.; ALVES, J. G.; NOGUEIRA, R. M.; GICOVATE NETO, C.; BASTOS, D. A.; SIQUEIRA, E. W.; SOUTO FILHO, J. T.; CEZARIO TDE, A.; SOARES, C. E.; CARNEIRO RDA, C. Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients with dengue fever: analysis of 1,585 cases. **Braz J Infect Dis**, v. 8, n. 2, p. 156-63, Apr 2004.

SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F.; PARLATO, M.; PHILIPPART, F.; MISSET, B.; CAVAILLON, J. M.; ADIB-CONQUY, M. Toll-like receptors expression and

interferon-gamma production by NK cells in human sepsis. **Crit Care**, v. 16, n. 5, p. R206, Oct 25 2012.

SPAIN-SANTANA, T. A.; MARGLIN, S.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. **J Med Virol**, v. 65, n. 2, p. 324-30, Oct 2001.

SRIKIATKHACHORN, A.; GREEN, S. Markers of dengue disease severity. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 338, p. 67-82, 2010.

ST JOHN, A. L.; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 420-6, Jun 2013.

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

SUNG, J. M.; LEE, C. K.; WU-HSIEH, B. A. Intrahepatic infiltrating NK and CD8 T cells cause liver cell death in different phases of dengue virus infection. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46292, 2012.

SZABO, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicol Lett**, v. 140-141, p. 105-12, Apr 11 2003.

SZABO, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 8, p. 662-80, Aug 2007.

SZATMARY, Z. Molecular biology of toll-like receptors. **Gen Physiol Biophys**, v. 31, n. 4, p. 357-66, Dec 2012.

TAKHAMPUNYA, R.; PADMANABHAN, R.; UBOL, S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. **J Gen Virol**, v. 87, n. Pt 10, p. 3003-11, Oct 2006.

TANAKA, S.; KOIZUMI, S.; MASUKO, K.; MAKIUCHI, N.; AOYAGI, Y.; QUIVY, E.; MITAMURA, R.; KANO, T.; OHKURI, T.; WAKITA, D.; CHAMOTO, K.; KITAMURA, H.; NISHIMURA, T. Toll-like receptor-dependent IL-12 production by dendritic cells is required for activation of natural killer cell-mediated Type-1 immunity induced by *Chrysanthemum coronarium* L. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 2, p. 226-32, Feb 2011.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T. H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J.; SUN, W.; ELLER, M. A.; PATTANAPANYASAT, K.; SARASOMBATH, S.; BIRX, D. L.; STEINMAN, R. M.; SCHLESINGER, S.; MAROVICH, M. A. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **J Exp Med**, v. 197, n. 7, p. 823-9, Apr 7 2003.

TOLFVENSTAM, T.; LINDBLOM, A.; SCHREIBER, M. J.; LING, L.; CHOW, A.; OOI, E. E.; HIBBERD, M. L. Characterization of early host responses in adults with dengue disease. **BMC Infect Dis**, v. 11, p. 209, 2011.

TOMINAGA, K.; YOSHIMOTO, T.; TORIGOE, K.; KURIMOTO, M.; MATSUI, K.; HADA, T.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. **Int Immunol**, v. 12, n. 2, p. 151-60, Feb 2000.

TORRES, S.; HERNANDEZ, J. C.; GIRALDO, D.; ARBOLEDA, M.; ROJAS, M.; SMIT, J. M.; URCUQUI-INCHIMA, S. Differential expression of Toll-like receptors in dendritic cells of patients with dengue during early and late acute phases of the disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 2, p. e2060, 2013.

TORRES-DUENAS, D.; CELES, M. R.; FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; DAL-SECCO, D.; DALTO, V. F.; ROSSI, M. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 3, p. 341-52, Oct 2007.

TRUNG, D. T.; WILLS, B. Systemic vascular leakage associated with dengue

infections - the clinical perspective. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 338, p. 57-66, 2010.

UBOL, S.; CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KASISITH, J.; KLUNGTHONG, C. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. **Virology**, v. 376, n. 2, p. 290-6, Jul 5 2008.

UBOL, S.; MASRINOUL, P.; CHAIJARUWANICH, J.; KALAYANAROOJ, S.; CHAROENSIRISUTHIKUL, T.; KASISITH, J. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, v. 197, n. 10, p. 1459-67, May 15 2008.

URCUQUI-INCHIMA, S.; PATINO, C.; TORRES, S.; HAENNI, A. L.; DIAZ, F. J. Recent developments in understanding dengue virus replication. **Adv Virus Res**, v. 77, p. 1-39, 2010.

VALERO, N.; ESPINA, L. M.; ANEZ, G.; TORRES, E.; MOSQUERA, J. A. Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 6, p. 762-4, Jun 2002.

VAN BOXEL-DEZAIRE, A. H.; RANI, M. R.; STARK, G. R. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. **Immunity**, v. 25, n. 3, p. 361-72, Sep 2006.

VAN DER SCHAAR, H. M.; RUST, M. J.; CHEN, C.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; WILSCHUT, J.; ZHUANG, X.; SMIT, J. M. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 12, p. e1000244, Dec 2008.

VAUGHN, D. W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T. P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A.; NISALAK, A. Dengue viremia titer, antibody

response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J Infect Dis**, v. 181, n. 1, p. 2-9, Jan 2000.

WANG, L.; CHEN, R. F.; LIU, J. W.; YU, H. R.; KUO, H. C.; YANG, K. D. Implications of dynamic changes among tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), membrane TNF receptor, and soluble TNF receptor levels in regard to the severity of dengue infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 2, p. 297-302, Aug 2007.

WATANABE, Y.; SUZUKI, O.; HARUYAMA, T.; AKAIKE, T. Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. **J Cell Biochem**, v. 89, n. 2, p. 244-53, May 15 2003.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 7, p. 518-28, Jul 2007.

WILDER-SMITH, A. Dengue infections in travellers. **Paediatr Int Child Health**, v. 32 Suppl 1, p. 28-32, May 2012.

WILDER-SMITH, A.; RENHORN, K. E.; TISSERA, H.; ABU BAKAR, S.; ALPHEY, L.; KITTAYAPONG, P.; LINDSAY, S.; LOGAN, J.; HATZ, C.; REITER, P.; ROCKLOV, J.; BYASS, P.; LOUIS, V. R.; TOZAN, Y.; MASSAD, E.; TENORIO, A.; LAGNEAU, C.; L'AMBERT, G.; BROOKS, D.; WEGERDT, J.; GUBLER, D. DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. **Glob Health Action**, v. 5, 2012.

WU, M. F.; CHEN, S. T.; YANG, A. H.; LIN, W. W.; LIN, Y. L.; CHEN, N. J.; TSAI, I. S.; LI, L.; HSIEH, S. L. CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. **Blood**, v. 121, n. 1, p. 95-106, Jan 3 2013.

YANG, K. D.; LEE, C. S.; HWANG, K. P.; CHU, M. L.; SHAIIO, M. F. A model to study cytokine profiles in primary and heterologously secondary Dengue-2 virus infections. **Acta Virol**, v. 39, n. 1, p. 19-21, Feb 1995.

YAUCH, L. E.; SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease.

Antiviral Res, v. 80, n. 2, p. 87-93, Nov 2008.

YEN, Y. T.; CHEN, H. C.; LIN, Y. D.; SHIEH, C. C.; WU-HSIEH, B. A. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. **J Virol**, v. 82, n. 24, p. 12312-24, Dec 2008.

YOSHIDA, T.; OMATSU, T.; SAITO, A.; KATAKAI, Y.; IWASAKI, Y.; KUROSAWA, T.; HAMANO, M.; HIGASHINO, A.; NAKAMURA, S.; TAKASAKI, T.; YASUTOMI, Y.; KURANE, I.; AKARI, H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. **Arch Virol**, v. 158, n. 6, p. 1209-20, Jun 2013.

ZACHARIAH, R. R.; SCHMID, S.; BUERKI, N.; RADPOUR, R.; HOLZGREVE, W.; ZHONG, X. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. **Obstet Gynecol**, v. 112, n. 4, p. 843-50, Oct 2008.

ZHANG, Q.; RAOOF, M.; CHEN, Y.; SUMI, Y.; SURSAL, T.; JUNGER, W.; BROHI, K.; ITAGAKI, K.; HAUSER, C. J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 104-7, Mar 4 2010.

ZHONG, X. Y.; VON MUHLENEN, I.; LI, Y.; KANG, A.; GUPTA, A. K.; TYNDALL, A.; HOLZGREVE, W.; HAHN, S.; HASLER, P. Increased concentrations of antibody-bound circulatory cell-free DNA in rheumatoid arthritis. **Clin Chem**, v. 53, n. 9, p. 1609-14, Sep 2007.

ZINGARELLI, B.; CUZZOCREA, S.; SZABO, C.; SALZMAN, A. L. Mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 287, n. 3, p. 1048-55, Dec 1998.

ZOUKI, C.; JOZSEF, L.; OUELLET, S.; PAQUETTE, Y.; FILEP, J. G. Peroxynitrite mediates cytokine-induced IL-8 gene expression and production by human leukocytes. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 5, p. 815-24, May 2001.

ZOUKI, C.; ZHANG, S. L.; CHAN, J. S.; FILEP, J. G. Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. **FASEB J**, v. 15, n. 1, p. 25-27, Jan 2001.