



Rafael Elias Marques Pereira Silva

DESVENDANDO O PAPEL DO RECEPTOR CCR5 EM MODELO EXPERIMENTAL DE DENGUE EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito necessário à conclusão do Mestrado em Bioquímica e Imunologia.

Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 23 de janeiro de 2012

“Como você pode ver, não são as respostas que movem o mundo, são as perguntas”

Vinheta do canal Futura

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, às pessoas que foram essenciais no processo de entrada e conclusão do mestrado:

- Meu orientador, Mauro Teixeira, pelo respeito e confiança. Seu empenho, convicção, competência e inteligência são inspiradores.

- Minha co-orientadora, Danielle Souza, pelo apoio e atenção. Os exemplos de disciplina ao longo dos anos foram essenciais para que aproveitasse o período do mestrado ao máximo.

- Meu ex-colega, colaborador e amigo, Rodrigo Guabiraba. Responsável por me trazer ao Imunofarmacologia, me acompanha desde o começo. Agradeço pela confiança em deixar o projeto CCR5 x DENV em minhas mãos e por começar a me ensinar na prática, na teoria e na discussão o que é ciência. Excêntrico, é minha imagem de independência e conhecimento.

- Minha família: Roberto, Solange, Pedro e Kiko. Sem seu apoio emocional e financeiro, nunca seguiria a carreira acadêmica. Ao meu pai pelo exemplo de excelência e a minha mãe pelo sacrifício incondicional. Ao Pedro pelo companheirismo e por privar sempre pela qualidade no que faz. Ao Kiko por sempre ter ido atrás do que quis, um exemplo de força nos seus diferentes sentidos

- Minha namorada, Maíra Rodrigues, por estar lá nos melhores momentos e nos piores. Muito inteligente, compreensiva e companheira na ciência, esteve a par de tudo o que fiz no lab e me ajudou na teoria e na prática, pelas incontáveis noites e finais de semana que me fez companhia enquanto trabalhava.

- Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, pela oportunidade.

E também agradeço a todas essas pessoas, cujas contribuições não poderiam ter sido mais importantes, e variadas:

À Ana Luiza, minha colega IC, pela presteza, proatividade e pela enorme ajuda com os experimentos

Ao Daniel Cisalpino, Caio e Vivian, pela ajuda indispensável nos experimentos, discussões e pelos anos de convivência alegríssima.

Ao Remo e ao Bráulio, pela companhia no dia-a-dia do lab, pela amizade e pelas conversas em ciência

Ao Rafael Polidoro e ao Bruno Mota, por me ajudarem na purificação do DENV, que ainda não utilizei neste trabalho. Em especial ao Pomarola, pela companhia, discussões, amizade e exemplo.

À Ilma, Gil e Frank, pelo trabalho técnico que facilita muito a realização deste

À Ilda, pela pausa “salutar” do trabalho, no cafezinho da Bioquímica

Ao Mansur e ao Gustavo, pelas discussões eternas e interessantes, e pelo incentivo em seguir na vida acadêmica

Aos colegas dos Labs da Profa. Andrea Da Poian e Profa. Luciana Arruda, da UFRJ, por me receberem e me ajudarem com simpatia e presteza

Ao Oscar e à Leozinha, pela primeira oportunidade na iniciação científica, e por me ensinarem os fundamentos da cultura celular

Aos colegas do Lab ainda não mencionados: Fred, Flavão, Cris, Luciana, Livia (x3), Ana Letícia, Lucas Secchin, ao pessoal do lab. do Prof. Antônio e de ImunoBiofotônica.

À professora Vanessa Pinho, pelos animais tão requeridos neste trabalho

Ao pessoal do lab. de Vírus, pela ajuda freqüente ao disponibilizar sua infraestrutura de trabalho

Aos meus amigos, do colégio: Tiona, Gut, Tiaguinho e Natan, e da Bio: Ruiz, Poma, Lélis, Luiza, Fábio e muitos outros que não agradecerei por extenso!

Aos meus primos e tios, pelo incentivo e apoio

Ao INCT em dengue e aos órgãos de fomento de pesquisa, pelo apoio financeiro

RESUMO

A dengue é uma importante arbovirose humana, caracterizada por sua alta morbidade, causada pelo *Dengue virus* (DENV), que coloca em risco mais de 2.5 bilhões de pessoas. Apesar de sua relevância, os mecanismos de patogênese das formas mais graves da doença ainda são pouco compreendidos. A infecção é caracterizada por um processo inflamatório sistêmico, marcado por alterações hematológicas e produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias. Evidências relacionando o sistema das quimiocinas CC com a gravidade da dengue, e dados prévios do nosso grupo mostrando que camundongos deficientes no receptor de quimiocinas CC 5 (CCR5^{-/-}) são resistentes à infecção por DENV fundamentaram esta investigação do receptor CCR5 no contexto da dengue experimental. Camundongos do tipo selvagem (WT) e CCR5^{-/-} foram inoculados com 10 LD₅₀ de DENV adaptado ao camundongo para realização de ensaios de letalidade e avaliação de parâmetros inflamatórios. Camundongos CCR5^{-/-} são resistentes à infecção por diferentes sorotipos de DENV e a resistência pode ser conferida a camundongos WT pelo tratamento com antagonistas de CCR5 antes, mas não após a infecção. A infecção de culturas primárias de macrófagos peritoneais de camundongos WT e CCR5^{-/-} revelou que o receptor CCR5 não participa da entrada do DENV em macrófagos, mas sua deficiência leva ao atraso da replicação viral nas células. O atraso na replicação *in vitro*, capaz de gerar diferenças em até 10x na carga viral entre os grupos WT e CCR5^{-/-}, pode ser observado *in vivo*, pela redução marcante da carga viral nos tecidos CCR5^{-/-} em fases iniciais na infecção. A análise de parâmetros inflamatórios revelou que camundongos WT apresentam uma discreta doença ao 5º dia pós-infecção (p.i.) que evolui para um quadro grave ao pico da infecção, ao 7º dia p.i. Camundongos CCR5^{-/-}, apesar de infectados, nunca adoecem, apresentando uma resposta imune capaz de eliminar o vírus sem causar dano tecidual. Esses dados indicam que o receptor CCR5 é uma molécula do hospedeiro requerida à replicação do DENV em macrófagos, relevante na patogênese da doença. O estudo deste mecanismo pode levar ao desenvolvimento de alternativas eficazes para a prevenção e tratamento da dengue.

Palavras-chave: Dengue, CCR5, replicação, inflamação

ABSTRACT

Dengue is an important human arbovirolosis, a public health problem faced by 2.5 billion people. Infection is characterized by a systemic inflammatory response and hematological alterations that may evolve with shock and death in severe cases. Recent clinical and experimental data have shown an association between components of the chemokine network and severity of Dengue, and previous data from our group indicates that CC chemokine receptor 5 deficient mice (CCR5^{-/-}), are markedly protected against dengue virus disease, leading to the investigation of the role of CCR5 receptor in a mice model of dengue. Wild-type (WT) and CCR5^{-/-} mice were inoculated with 10 LD₅₀ for lethality assays and evaluation of disease signs. CCR5^{-/-} mice are resistant to infection by different DENV serotypes, and resistance can be conferred to WT mice by treatment with CCR5 antagonists before infection, but not after. Infection of primary macrophages cultures from WT and CCR5^{-/-} mice with DENV-2 reveal that CCR5 is not involved in viral entry in macrophages, but deficiency in CCR5 delays DENV replication in these cells. The viral replication delay observed in the *in vitro* assays, responsible for a 10-fold decrease in viral load in CCR5^{-/-} macrophages, was also observed *in vivo* by the reduced viral load in CCR5^{-/-} mice' tissues at early phases of infection. Analysis of the inflammatory parameters showed that WT mice present a discrete disease at day 5 post-infection (p.i.), which becomes severe and lead to shock and death at day 7 p.i. CCR5^{-/-} never present disease, besides being infected with DENV. The immune response generated by CCR5^{-/-} mice can eliminate DENV from host without causing tissue damage. Together, these data indicate that the CCR5 receptor is a host factor required for proper DENV replication in macrophages. CCR5 receptor participates in disease pathogenesis and impacts infection outcome. Investigation of the mechanisms underlying the requirement of the CCR5 receptor by DENV, as well as how such effective immune response is generated in CCR5^{-/-} mice, could lead to the development of preventive and therapeutic approaches for dengue treatment.

Key-words: Dengue, CCR5, Replication, Inflammation

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	13
Dengue vírus.....	13
Dados epidemiológicos.....	14
Infecção e imunopatogênese.....	15
O receptor CCR5 e infecções virais.....	16
Camundongos CCR5 ^{-/-} são resistentes à infecção experimental por DENV-2.....	19
JUSTIFICATIVA.....	23
OBJETIVOS.....	24
METODOLOGIA.....	25
Utilização de camundongos e aprovação do comitê de ética	25
Vírus	25
Infecção e desenho experimental <i>in vivo</i>	26
Desenho experimental <i>in vitro</i>	27
Titulação Viral	28
Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa	29
Parâmetros hematológicos	29
Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)	29
Quantificação dos níveis de citocinas	30
Citometria de fluxo	30
Análise estatística e construção dos gráficos	30
RESULTADOS.....	32
Camundongos CCR5 ^{-/-} são resistentes a diferentes sorotipos de DENV adaptado ao hospedeiro murino	32
Explorando o tempo e o inóculo viral na sobrevivência de camundongos CCR5 ^{-/-} frente à infecção experimental por DENV-2.....	33
UK-484900 protege camundongos WT da mortalidade decorrente da infecção por DENV-2 quando administrado previamente à infecção	34
A deficiência na expressão do receptor CCR5 não interfere na entrada do DENV-2 nas células.....	35

A deficiência no receptor CCR5 atrasa a replicação do DENV em macrófagos ...	39
Camundongos CCR5 ^{-/-} apresentam reduzida carga viral nos tecidos nas fases iniciais da infecção por DENV-2.....	42
Camundongos CCR5 ^{-/-} não desenvolvem a doença associada à infecção por DENV-2.....	45
O receptor CCR5 é expresso nos tecidos de camundongos WT infectados e sua expressão varia ao longo da infecção.....	49
A resposta do camundongo CCR5 ^{-/-} à infecção por DENV é marcada por uma elevada ativação de linfócitos no baço	50
DISCUSSÃO	54
SUMÁRIO E CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE – Intensificação da infecção dependente de anticorpos

ATCC – *American Type Culture Collection*

BSA – albumina sérica bovina

cAMP – Adenosina monofosfato cíclica

CCL3, CCL4, CCL5 – quimiocinas, Ligantes CC número 3, 4 e 5

CCR5 – receptor de quimiocinas CC 5

CCR5^{-/-} - camundongo deficiente no receptor CCR5

CD – *Cluster of differentiation*

Ct – *Cycle threshold*

DENV – Dengue vírus

FD – Febre do dengue

FHD – Febre hemorrágica do dengue

HCV – Vírus da hepatite C

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IFN- γ – interferon gama

IL-n – Interleucina número n

JAK-STAT – *Janus kinase – signal transducer and activator of transcription*

JNK - *Jun-N-terminal kinase*

LD₅₀ – Dose letal para 50% dos animais no grupo experimental

MIP-1 α , MIP-1 β – *Macrophage inflammatory protein 1 alfa/beta*. (CCL3, CCL4)

MOI – multiplicidade de infecção

NK – Células *Natural Killer*

NKT – Células T *Natural Killer*

NS n – Proteína não-estrutural do vírus da dengue

PBS – salina tamponada de fosfato

PCR – reação em cadeia da polimerase

PFU – Unidades formadoras de placa de lise

p.i. – pós-infecção

PI3K – fosfatidilinositol 3-cinase

PKA/PKC - proteína cinase A/C

PTX – Toxina pertussis, toxina botulínica

RANTES – *Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*.
(CCL5)

RNA – Ácido ribonucléico

SCD – Síndrome do choque do dengue

SFB – soro fetal bovino

TBEV – Vírus da encefalite transmitida por carrapato, *Tick-borne encephalitis virus*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

WNV – Vírus da encefalite do oeste do Nilo, *West Nile encephalitis virus*

WT – camundongo do tipo selvagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Camundongos CCR5 ^{-/-} são extremamente resistentes à infecção experimental por DENV-2.	19
Figura 2 - Camundongos CCR5 ^{-/-} não sucumbem à doença associada à infecção por DENV-2 e possuem carga viral muito reduzida.....	20
Figura 3 - Tratamento com o antagonista do receptor CCR5 Met-RANTES antes, mas não após a infecção, reproduz a proteção encontrada no camundongo CCR5 ^{-/-}	22
Figura 4 – Esquema representativo dos experimentos in vivo.	27
Figura 5 - Camundongos CCR5 ^{-/-} são resistentes a diferentes sorotipos de DENV adaptado.	32
Figura 6 - Explorando o tempo e o inoculo viral na sobrevivência de camundongos CCR5 ^{-/-} frente à infecção experimental por DENV-2.	33
Figura 7 - Pré-tratamento com UK-484900, mas não o pós-tratamento, protege camundongos WT contra infecção letal por DENV-2	35
Figura 8 - O receptor CCR5 não está envolvido na entrada do DENV-2 16681 em células GHOST	36
Figura 9 - Padronização do sistema in vitro de infecção de macrófagos peritoneais murinos por DENV	37
Figura 10 - O receptor CCR5 não está envolvido na entrada do DENV-2 adaptado ao camundongo em macrófagos	38
Figura 11 - DENV-2 se replica lentamente em células CCR5 ^{-/-}	39
Figura 12 - Análise da inclinação das curvas de replicação celular em macrófagos WT e CCR5 ^{-/-}	41
Figura 13 - Pré-tratamento com Met-RANTES ou PTX prejudicam a replicação viral em células WT.....	42
Figura 14 - Camundongos CCR5 ^{-/-} apresentam reduzida carga viral nos tecidos nas fases iniciais de infecção por DENV-2	44
Figura 15 - Camundongos CCR5 ^{-/-} não apresentam alterações hematológicas nas fases iniciais de infecção por DENV-2	46
Figura 16 - Camundongos CCR5 ^{-/-} e WT não apresentam diferenças no acúmulo de neutrófilos nos tecidos ao 5º dia após infecção por DENV-2	47
Figura 17 - Camundongos CCR5 ^{-/-} e WT não apresentam diferenças na produção de citocinas ao 5º dia após infecção por DENV-2	48
Figura 18 - O receptor CCR5 é expresso nos tecidos de camundongos WT infectados e sua expressão aumenta ao longo da infecção.	50

Figura 19 - A expressão de CCR5 é aumentada em linfócitos T CD4+ e Células NK
ao 5º dia após infecção com DENV-2 51

Figura 20 - Camundongos CCR5-/- apresentam elevada frequência e ativação de
linfócitos ao 5º dia após infecção por DENV-2..... 52

INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose de maior morbidade em humanos, cujo agente etiológico é o *Dengue virus*. A infecção com algum dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, 2, 3 ou 4) pode resultar na febre do dengue (FD) ou nas formas graves da doença: a febre hemorrágica do Dengue (FHD) e a síndrome do choque do dengue (SCD) [1-3], apesar de grande parte das infecções se passar de forma assintomática [4]. Atualmente, estima-se a ocorrência de 50 milhões de casos de dengue e 25.000 mortes anualmente [5, 6].

Apesar de sua importância, os mecanismos patogênicos envolvidos na dengue ainda não são completamente compreendidos. Marcadores clínicos para o diagnóstico eficiente ainda não foram determinados, apesar de existirem estudos associando moléculas à gravidade da doença [7-11]. A falta de conhecimento dificulta o desenvolvimento de tratamentos específicos e vacinas, sendo a terapia atual baseada no acompanhamento do paciente e reposição de líquidos. Desta forma, além dos impactos sanitários e sociais, a dengue sobrecarrega economicamente os sistemas de saúde de países em desenvolvimento [1, 6, 12].

Dengue vírus

O DENV é composto por uma fita única de ácido ribonucléico (RNA) senso positivo, de aproximadamente 11 kilobases de tamanho. A atual classificação taxonômica coloca a espécie *Dengue virus* como membro da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus*. Seu ciclo de vida é composto por um ciclo silvático, que é mantido pela transmissão do vírus a primatas não-humanos, e um ciclo urbano, denominado endêmico/epidêmico, que envolve a transmissão do DENV ao homem [13, 14]. Até o momento, primatas são os únicos vertebrados sabidamente infectados pelo DENV, porém as cepas virais isoladas de humanos e primatas não-humanos são geneticamente distintas, indicando que esses ciclos de transmissão divergiram no passado [15, 16]. Como a maioria dos flavivírus (vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*) descritos, o DENV requer um vetor artrópode para transmissão aos hospedeiros, representados por mosquitos do gênero *Aedes*, prevalecendo a espécie *Aedes aegypti* na transmissão ao homem.

O vírion (partícula viral infectiva madura) é composto por três proteínas estruturais: proteína C, do inglês *core*, que compõe o capsídeo e interage diretamente com o material genético viral; a proteína M, referente a “membrana” e a proteína E (“envelope”) que se encontra associada à proteína M no envelope lipídico revestindo a partícula viral. O genoma viral codifica as três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais, nomeadas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, que coordenam a replicação viral e medeiam parte dos processos imunopatológicos na dengue [17-20]. Os quatro sorotipos do vírus da dengue foram numerados em função da ordem de identificação [21], e apresentam aproximadamente 66% de homologia genômica, até 75% de homologia nas seqüências de aminoácidos, com propriedades antigênicas similares [22].

O ciclo de replicação do DENV se inicia com a ligação do vírus à célula, seguida de endocitose mediada pelo receptor viral e internalização em endossomos. A acidificação dos endossomos leva a mudanças conformacionais na proteína E que iniciam o processo de fusão com a membrana endossomal e resultam na liberação do genoma viral no citoplasma [23]. A tradução do RNA viral em uma poliproteína no retículo plasmático rugoso é seguida de seu processamento e clivagem por proteases do vírus e do hospedeiro. As proteínas NS coordenam a tradução de novas proteínas e a replicação do RNA viral, associando-o à proteína C e posteriormente ao envelope lipídico contendo as proteínas E e prM na passagem à luz do retículo endoplasmático rugoso [17-20]. As partículas virais imaturas geradas são conduzidas à via de secreção, sendo novamente processadas no complexo trans-Golgi, para clivagem da porção pr da proteína M e, finalmente, secreção das partículas virais maduras [23-26]. A clivagem da porção pr da proteína M é ineficiente, resultando em uma alta proporção de vírions imaturos que têm sido relacionados a estratégias virais de evasão imune e intensificação da infecção dependente de anticorpos [27].

Dados epidemiológicos

A dengue constitui um grave problema de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais do globo, onde a incidência, distribuição e gravidade dos casos de dengue têm aumentado dramaticamente nos últimos 60 anos [12], o que levou à sua classificação como virose re-emergente [13]. De acordo com a Organização Mundial

de Saúde (WHO), a dengue é presente em mais de 100 países e totaliza mais de 2.5 bilhões de pessoas em risco de contrair a doença [5]. No Brasil, houve 944.662 casos em 2010 e mais de 720.000 até setembro de 2011, período referente à 1ª a 39ª semana epidemiológica deste ano. Dentre as notificações, 10.620 correspondem a casos graves de dengue e até o período foram confirmados 468 óbitos [28].

O Brasil convive com epidemias de dengue desde 1981. A dispersão da dengue e a ocorrência de epidemias pelo território brasileiro são atribuídas à presença do mosquito-vetor e da circulação dos sorotipos do vírus [29].

Infecção e imunopatogênese

A FD é caracterizada pela presença de vários sinais clínicos e sintomas inespecíficos, similar a um quadro gripal. Por volta de sete dias após a infecção, o paciente apresenta dores corporais intensas, náusea, vômitos e *rash* cutâneo, se recuperando em até duas semanas após o início da febre [3, 30]. As formas graves da dengue são caracterizadas por uma intensa resposta inflamatória que inclui manifestações hemorrágicas, hemoconcentração, trombocitopenia e aumento da permeabilidade vascular [31-33]. Essas manifestações graves da dengue se iniciam de forma aguda, semelhante à FD, seguidas de evolução rápida e deterioração súbita do quadro do paciente, resultando em choque hipovolêmico e ao óbito se não tratadas apropriadamente [34, 35].

O desenvolvimento das formas graves envolve a interação entre fatores virais e do hospedeiro, que incluem o sorotipo e genótipo viral [36]; o *background* genético e idade do hospedeiro [37], e infecções recorrentes com sorotipos distintos [38, 39]. Inclusa nestes fatores, a resposta imune do hospedeiro influencia o desenvolvimento da dengue, em uma interação que pode levar tanto à melhora quanto ao agravamento da doença [24]. Dentre os mecanismos propostos como responsáveis pela ocorrência de casos graves, o fenômeno da intensificação da infecção dependente de anticorpos (*Antibody dependent enhancement, ADE*) e o “Pecado antigênico original” (*Original Antigenic sin*) tem tido destaque. Na ADE, anticorpos subneutralizantes produzidos durante uma infecção prévia com um sorotipo distinto do vírus potencializam a entrada do DENV nas células do hospedeiro durante a infecção presente, via receptores de anticorpos Fcγ,

intensificando-a e agravando-a [40, 41]. De forma similar, o “Pecado antigênico original” se refere à expansão de linfócitos T de memória, gerados em infecções anteriores, que quando expostos a uma nova infecção por um sorotipo diferente do vírus, respondem de forma alterada e prejudicial ao hospedeiro, produzindo altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e contribuindo à patogênese da dengue [15, 42].

O DENV interage com várias células do sistema imune, com tropismo para células da linhagem fagocítica mononuclear, incluindo células dendríticas [43], células de Langerhans [44], monócitos e macrófagos [45, 46], que são considerados os principais alvos do vírus durante a infecção. Várias moléculas têm sido associadas à ligação do DENV nas células alvo, tais como as lectinas *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN), o receptor de manose e *C-type lectin domain family 5 member A* (CLEC-5A) [47-49], porém o receptor que medeia a internalização do DENV ainda não foi identificado [50].

O DENV também é capaz de infectar hepatócitos e células endoteliais [51, 52], que em conjunto com as células mielóides acima mencionadas, iniciam a produção de mediadores inflamatórios que moldam a resposta imune nos âmbitos inato e adaptativo e definem a gravidade da doença. Foi sugerido que a disfunção endotelial, que leva às alterações hematológicas e ao choque hipovolêmico comumente encontrado em casos de FHD e SCD, seja mediada pela resposta imune do hospedeiro [35]. A produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, já observadas em pacientes com dengue grave [15, 32], incluem: fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-12 [53], interferon- γ (IFN- γ) [24, 54] e vários fatores endoteliais e de coagulação [15]. Não somente a presença, mas também o grau no qual os níveis dos mediadores aumentam podem ser relacionados à gravidade da dengue. Desta forma, entender como essa produção massiva de citocinas é induzida na dengue, e eventualmente controlada, permitiria a modulação desta resposta inflamatória excessiva e conseqüentemente da doença.

O receptor CCR5 e infecções virais

O receptor de quimiocinas CC 5 (CCR5) é um membro da superfamília de receptores de 7 domínios transmembrana acoplados à proteína G (GPCR),

agrupado a uma subclasse que engloba todos os receptores de quimiocinas [55]. Por definição, os receptores de quimiocinas são capazes de mediar o recrutamento e quimiotaxia de leucócitos em função do gradiente de concentração de seu(s) ligante(s). A sinalização do receptor CCR5 envolve a classe de proteínas $G_{i/o}$, cuja ativação pelo ligante resulta na inibição da síntese de cAMP, liberação de cálcio, ativação de MAP cinases, *Jun-N-terminal kinase* (JNK), das proteínas cinases C (PKC) e PKA [56] e ativação da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K). O CCR5 também pode se homodimerizar ou heterodimerizar com outros receptores de quimiocinas, podendo sinalizar via proteínas JAK-STAT [57]. Após a sua ativação, as porções fosforiladas da cauda citoplasmática do receptor CCR5 recrutam β -arrestinas que medeiam a internalização do receptor dependente de clatrin [58]. O receptor CCR5 é expresso em várias células do sistema imune: linfócitos T efetores e de memória, linfócitos T $CD4^+$ *helper* tipo 1, células *Natural killer* (NK), células T *Natural killer* (NKT), monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas, células de *Langerhans* e basófilos [58], sendo expresso em uma ampla variedade de tecidos [59] e células não-hematopoiéticas [58, 60, 61].

Além de sua atividade intrínseca no recrutamento de células do sistema imune, o receptor CCR5 também é associado à angiogênese [62], ativação e proliferação celular [63, 64]. O CCR5 exerce atividades pro-inflamatórias, sendo associado a respostas imunes adaptativas do tipo Th1 e foi estudado em desordens inflamatórias agudas e crônicas [65-68], nas quais o receptor pode agravar ou melhorar o quadro da doença.

O receptor CCR5 foi originalmente descrito por Combadiere e colaboradores em 1996 [69] como o receptor para as quimiocinas *Macrophage inflammatory protein-1 α* (MIP-1 α), MIP-1 β e Regulated upon Activation Normal T Expressed and Secreted (RANTES) conhecidas na nomenclatura atual como CCL3, CCL4 e CCL5, respectivamente [70]. O receptor CCR5 também pode ser ativado pela ligação da *Heat-shock protein 70*, que não é classificada no sistema das quimiocinas [71]. A descoberta do CCR5 é concomitante à sua associação ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), atuando como o co-receptor na entrada do HIV em macrófagos [72]. Indivíduos homozigotos para o alelo *ccr5 Δ 32*, que possui uma deleção de 32 pares de bases na região codificadora da proteína, expressam um CCR5 não funcional. Esses indivíduos são resistentes à infecção pelo HIV, mesmo quando expostos

freqüentemente ao vírus [73]. Esse aspecto da biologia do HIV tem sido extensivamente explorado, resultando no desenvolvimento e aplicação de inibidores e antagonistas de CCR5 para o tratamento da síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) [74-76].

A associação do receptor CCR5 com o HIV foi a primeira dentre várias associações com patógenos. O receptor CCR5 é envolvido em várias doenças infecciosas, causadas por protozoários [77, 78], bactérias [79], fungos [80] e especialmente vírus. Como revisado por Klein e colaboradores [81], portar o alelo *ccr5Δ32* pode ser um fator de risco em infecções por flavivirus, que dividem o mesmo gênero com o DENV. A prevalência do alelo *ccr5Δ32* é associada com a ocorrência de meningoencefalite grave causada por infecção com o vírus da encefalite transmitida pelo carrapato (*Tick-borne Encephalitis Virus* - TBEV) [82] e com infecções sintomáticas pelo vírus da encefalite do oeste do nilo (*West Nile Virus* – WNV) [83]. Em um modelo murino de infecção pelo WNV, a expressão de CCR5 é aumentada em camundongos selvagens e os animais deficientes em CCR5 são muito susceptíveis à infecção. Neste modelo, o CCR5 é essencial para que linfócitos T, células Natural Killer (NK) e macrófagos migrem para o sistema nervoso central, controlando a replicação do WNV e prevenindo a mortalidade decorrente da infecção [84].

Durante a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), que também pertence à família *Flaviviridae*, a diminuição da expressão de CCR5 em linfócitos T CD8⁺ resulta em menor recrutamento linfocitário ao fígado e favorece a proliferação viral, bem como a cronificação da hepatite [85]. Em outro exemplo de subversão do receptor CCR5 por vírus, a expressão deste receptor é capaz de conferir permissividade de células à infecção, independente de atuação no processo de entrada viral. A expressão de CCR5 em linfócitos T possibilita a replicação de *Vaccinia vírus* através de sua sinalização intracelular, na qual uma cascata de fosforilação de tirosinas a partir do CCR5 é necessária à organização e sinalização de proteínas virais e posterior replicação do vírus [86]. Esse suporte à replicação de *Vaccinia vírus in vitro* acompanha a disseminação do vírus no hospedeiro, em um modelo animal em camundongos, no qual as células CCR5⁺ infiltram-se em órgãos-alvo carregando a progênie viral [87].

A produção excessiva de citocinas apresentada por pacientes com dengue grave, denominada *cytokine storm*, inclui altos níveis de quimiocinas CC, cuja participação é sugerida na patologia da dengue. A expressão de todos os ligantes do receptor CCR5 foi demonstrada em pacientes e em diferentes modelos de dengue: CCL3/MIP-1 α nos momentos iniciais pós-infecção em culturas de leucócitos de sangue periférico [88], CCL4/MIP-1 β no sangue de pacientes com dengue moderada a grave, sendo sugerido como um marcador para a gravidade da doença [7], e CCL5/RANTES em macrófagos, em outros modelos animais e em culturas *in vitro* de mastócitos [89-91]. Trabalhos recentes do nosso grupo demonstraram que camundongos deficientes para os receptores de quimiocinas CC CCR1, CCR2 e CCR4 apresentam doença reduzida após infecção com DENV-2, comparados a camundongos do tipo selvagem, apoiando o envolvimento da rede das quimiocinas e seus receptores na patogenia da dengue [90].

Em conjunto, o papel do receptor CCR5 em doenças com grande componente inflamatório, o corpo extenso de evidências associando este receptor a infecções virais e processos patológicos desencadeados por flavivírus, e o fato de que o receptor CCR5 interage com moléculas sabidamente envolvidas na doença fundamentou a sua investigação no contexto de dengue.

Camundongos CCR5^{-/-} são resistentes à infecção experimental por DENV-2

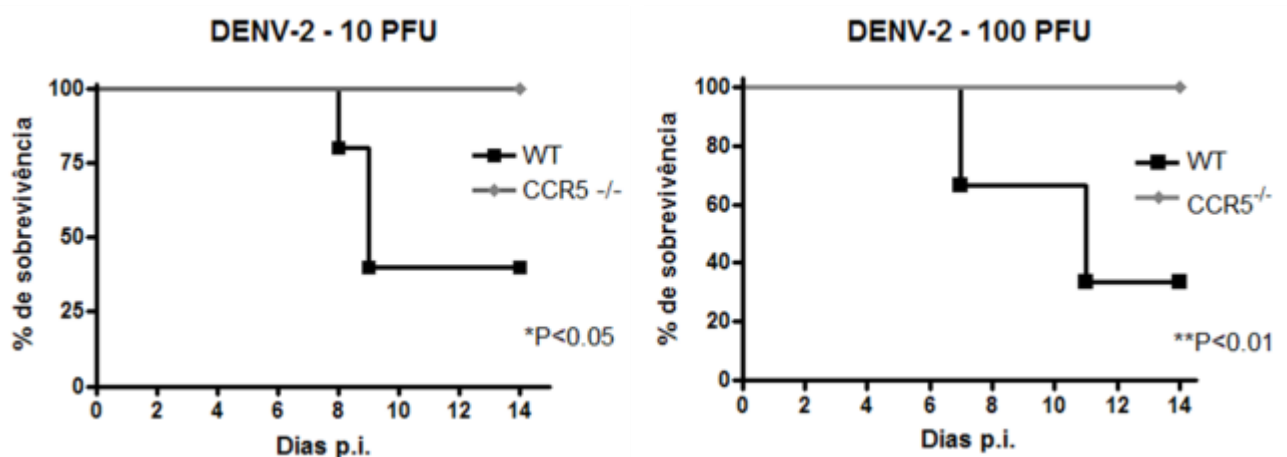


Figura 1 - Camundongos CCR5^{-/-} são extremamente resistentes à infecção experimental por DENV-2. Curvas de letalidade após inóculo intraperitoneal de DENV-2 a 10 PFU (10 LD₅₀) e 100 PFU (100 LD₅₀), respectivamente, em camundongos C57/B6 selvagens (WT) ou CCR5^{-/-}. O ponto de corte escolhido foi o 14º dia após infecção (p.i.). A diferença estatística entre as curvas WT e KO é definida por p<0.05 (10 LD₅₀) e p<0.01 (100 LD₅₀). Para cada curva de letalidade, n = 6-8 animais por grupo.

Para investigar o papel do receptor CCR5 na dengue, utilizamos o modelo experimental de dengue (sorotipo 2) em camundongos desenvolvido no laboratório (vide Metodologia, Vírus e Design Experimental *in vivo*) [92-94], no qual camundongos C57/B6 infectados com uma linhagem adaptada ao hospedeiro murino apresentam manifestações clínicas similares à dengue grave em humanos (alterações hematológicas, *cytokine storm*, inflamação sistêmica, dano tecidual, hipotensão, choque e conseqüente morte).

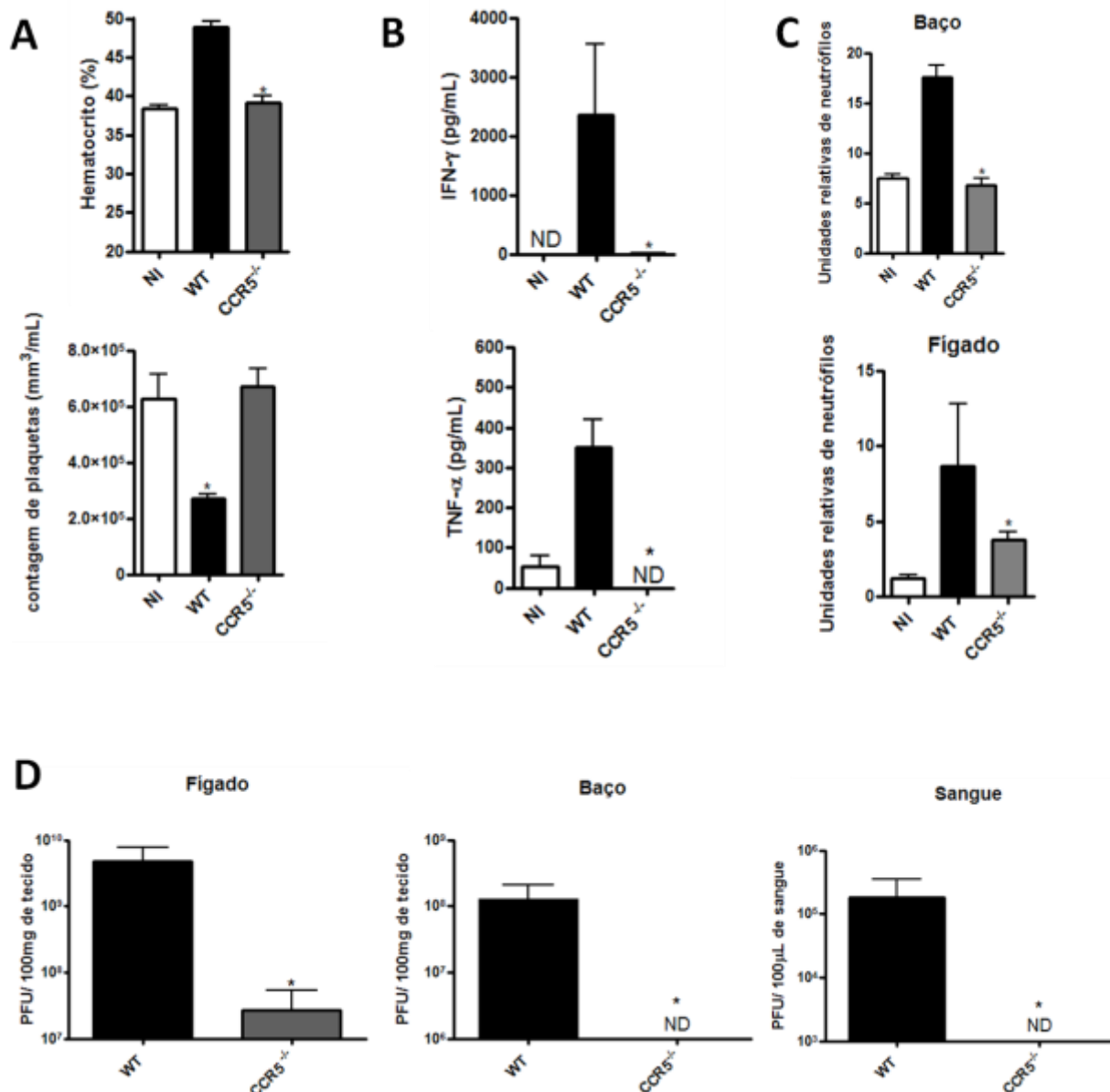


Figura 2 - Camundongos CCR5^{-/-} não sucumbem à doença associada à infecção por DENV-2 e possuem carga viral muito reduzida.

Camundongos WT e CCR5^{-/-} foram inoculados com 10 PFU (10LD₅₀) da linhagem de DENV-2 adaptada ao hospedeiro murino. Animais foram sacrificados ao 7º dia pós-infecção (p.i.), para obtenção de amostras. (A) índice de hematócrito e contagem de plaquetas, indicativos de alteração hematológica. (B) Níveis de IFN-γ and TNF-α em homogenatos do baço. (C) Ensaio de atividade de MPO, indicativo do influxo de neutrófilos nos tecidos, em baço e fígado. (D) Carga de DENV-2 nos órgãos e sangue. Dados são representativos de dois

experimentos independentes. *P< 0.05 relativo aos controlos WT infectados. NI – WT não-infectado. ND - Não-detectável.

Observou-se que camundongos deficientes no receptor CCR5 (CCR5^{-/-}) são completamente protegidos na infecção letal por DENV-2 em diferentes inóculos, ao contrário de camundongos do tipo selvagem (WT), que apresentam aproximadamente 30% de sobrevivência ao fim dos ensaios de letalidade, ao 14º dia pós-infecção (FIG.1).

Camundongos CCR5^{-/-} não apresentam quaisquer parâmetros de doença ao 7º dia pós-infecção, considerado o pico da infecção/doença, contrários ao quadro grave apresentado pelos camundongos WT (FIG.2). Os camundongos CCR5^{-/-} não possuem nenhuma alteração na contagem de plaquetas, índice de hematócrito normal (FIG.2A), baixos níveis de citocinas (FIG.2B) e reduzido influxo de neutrófilos nos tecidos (FIG.2C), que correspondem a medidas utilizadas para observar a inflamação sistêmica e alteração hematológica observada na dengue grave. De forma marcante, enquanto são encontrados elevados títulos virais nos tecidos de camundongos WT, a carga viral nos tecidos de camundongos CCR5^{-/-} não é detectável ou é extremamente reduzida durante o pico da infecção (FIG.2C).

O fenótipo de proteção apresentado por camundongos CCR5^{-/-} frente à infecção letal por DENV-2 pode ser reproduzido em camundongos WT pela administração do antagonista do receptor CCR5 Met-RANTES [95] (FIG.3). A proteção contra a doença é observada caso o tratamento diário com o antagonista seja iniciado anteriormente (um dia) à infecção por DENV, em uma estratégia preventiva (Pré-Tratamento), que se estende ao dia 6 após infecção. Desta forma, os camundongos WT apresentam pouca ou nenhuma plaquetopenia e hemoconcentração (FIG.3A), baixos níveis de citocinas pro-inflamatórias (FIG.3B) e reduzida atividade de MPO nos tecidos, indicativa do influxo de neutrófilos nos órgãos (FIG.3C). O pré-tratamento com Met-RANTES também foi eficaz em reduzir a carga viral nos tecidos e sangue dos camundongos tratados, em comparação a grupos WT não tratados (FIG.3D).

Em contrapartida, o pós-tratamento com Met-RANTES, no qual a administração diária do fármaco se inicia três dias após a infecção com DENV e se encerra no dia 6 após infecção, se mostrou ineficaz em reproduzir a proteção observada no camundongo CCR5^{-/-}. O pós-tratamento foi incapaz de evitar

alterações hematológicas (FIG.3A), produção de citocinas (FIG.3B), acúmulo de neutrófilos nos tecidos (FIG.3C) e crescimento da carga viral ao pico da infecção (7^o dia pós-infecção) (FIG.3D), associados neste modelo com a piora, choque e decorrente morte do animal. O detalhamento das estratégias de infecção com DENV-2 e tratamento com Met-RANTES se encontram na seção de metodologia desta dissertação (Infecção e desenho experimental *in vivo* - FIG.4).

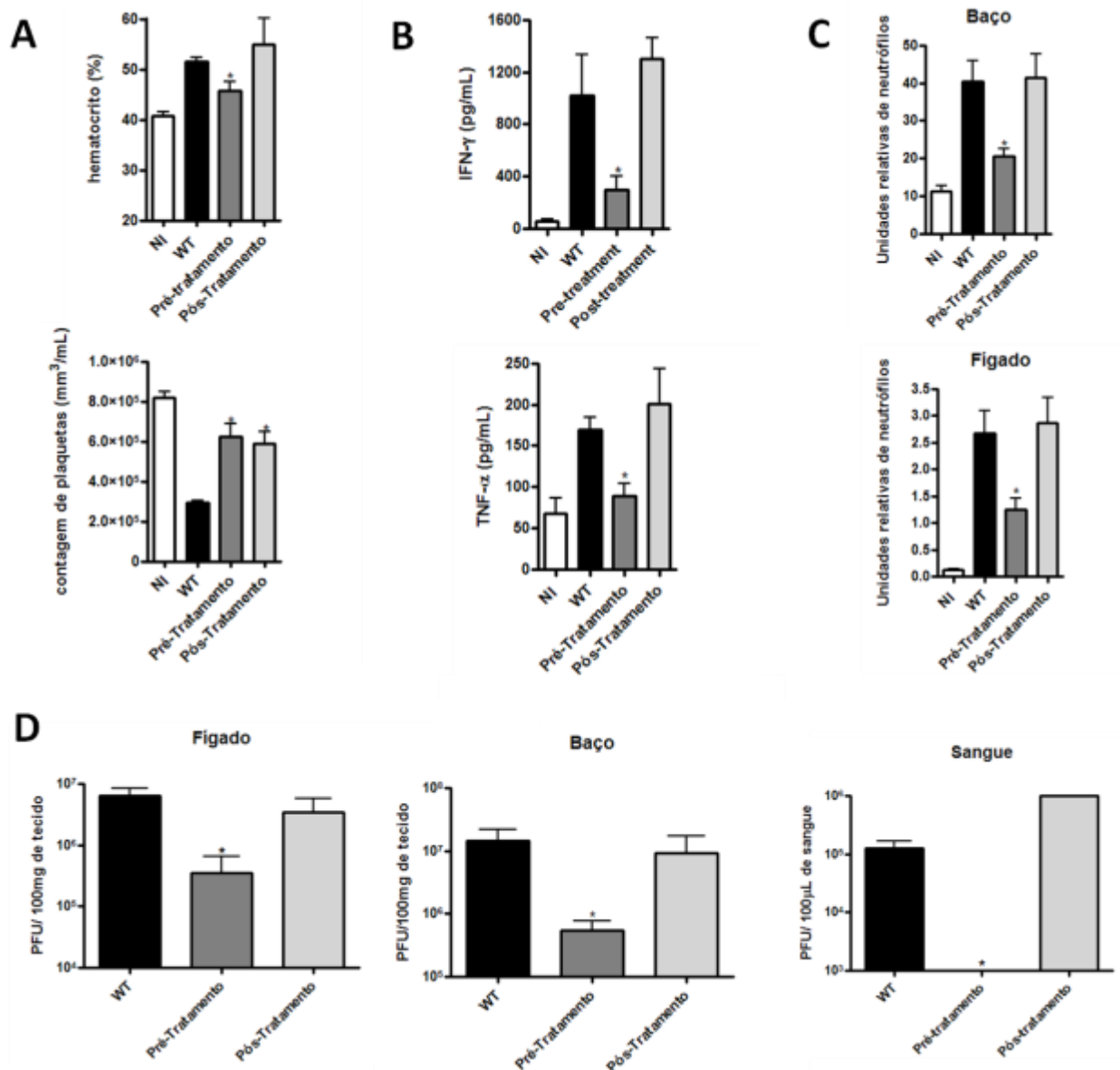


Figura 3 - Tratamento com o antagonista do receptor CCR5 Met-RANTES antes, mas não após a infecção, reproduz a proteção encontrada no camundongo CCR5^{-/-}.

Camundongos WT foram injetados via subcutânea com 10µg de Met-RANTES diariamente, um dia antes da infecção ao 6^o dia pós-infecção (pré-tratamento) ou ao 3^o dia pós-infecção até o 6^o dia pós-infecção (pós-tratamento). Camundongos foram inoculados intra-peritonealmente com 10 PFU (10LD₅₀) da linhagem de DENV-2 adaptada ao hospedeiro murino. Animais foram sacrificados ao 7^o dia pós-infecção (p.i.), para obtenção de amostras. (A) Índice de hematócrito e contagem de plaquetas, indicativos de alteração hematológica. (B) Níveis de IFN-γ and TNF-α em homogenatos do baço. (C) Ensaio de atividade de MPO, indicativo do influxo de neutrófilos nos tecidos, em baço e fígado. (D) Carga de DENV-2 nos órgãos e sangue. Carga viral nos órgãos e sangue. Dados são representativos de dois experimentos independentes. *P< 0.05 relativo aos controles WT infectados. NI – Não-infectado

JUSTIFICATIVA

O modelo de dengue experimental padronizado pelo grupo e o envolvimento do receptor CCR5 em infecções causadas por flavivirus e por outros vírus de grande importância clínica, especialmente nos processos de infecção e replicação viral, levou à hipótese de que o receptor CCR5 também participaria dos processos de infecção e replicação do DENV.

Desta forma, utilizando animais CCR5^{-/-}, a investigação do mecanismo responsável pelo fenótipo de resistência se tornou necessária, especialmente devido ao grau de proteção observado nestes animais após a infecção por DENV. A ausência de inflamação excessiva ao 7º dia pós-infecção no camundongo CCR5^{-/-} correlaciona com a ausência de mortalidade decorrente da infecção, porém os mecanismos pelos quais essa resposta inflamatória era modulada ainda eram desconhecidos. Ainda mais relevante, a carga viral reduzida apontava para um mecanismo crucial na infecção por DENV, dependente do receptor CCR5. O sucesso exclusivo do tratamento pré-infecção com o antagonista Met-RANTES, em detrimento do tratamento pós-infecção, sugeria um papel para o receptor CCR5 em momentos iniciais no curso da infecção.

Nesta dissertação, apresento os resultados obtidos na investigação do papel do receptor CCR5 na infecção experimental por DENV, as conclusões e as perspectivas originadas da pesquisa.

OBJETIVOS

Investigar os possíveis mecanismos pelos quais o receptor CCR5 participa na patogênese da dengue, utilizando uma abordagem *in vitro* e *in vivo*, baseada no modelo experimental em camundongos.

Objetivo Geral

Determinar o mecanismo pelo qual camundongos CCR5^{-/-} são protegidos da infecção letal por DENV-2.

Objetivos Específicos

Confirmar a sobrevivência marcante de camundongos CCR5^{-/-} frente à infecção letal por DENV com outra linhagem viral adaptada ao camundongo e em períodos de tempo posteriores ao 14^o dia.

Confirmar a eficácia do bloqueio farmacológico do receptor CCR5 pelo uso de outro antagonista

Analisar a infecção por DENV-2 em culturas primárias de células originadas de camundongos CCR5^{-/-} *in vitro*, para determinar possíveis interações entre DENV e o receptor CCR5 que possam explicar a resistência associada à deficiência do receptor

Estudar o perfil inflamatório e clínico em *time-points* prévios ao pico da doença, (ao 7^o dia pós-infecção) com a linhagem adaptada de DENV-2 em camundongos CCR5^{-/-}, a fim de determinar os eventos cruciais responsáveis pela resistência à infecção e morte

Estudar as populações celulares possivelmente associadas à resposta imune protetora contra a infecção por DENV-2 observada nos camundongos CCR5^{-/-} em contraste à resposta imune no camundongo WT

METODOLOGIA

Utilização de camundongos e aprovação do comitê de ética

Camundongos WT da linhagem C57BL/6 (H-2D^b) foram adquiridos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG (Belo Horizonte, Minas Gerais). Camundongos CCR5^{-/-}, cruzados pelo menos 10 vezes na linhagem C57BL/6, foram doados pela professora Dr. Leda Quércia Vieira. Todos os animais foram mantidos no biotério do laboratório até atingirem a idade de experimentação (8 a 12 semanas de idade) em condição *specific pathogen-free* (SPF). Animais foram tratados com Ivermectina 1% pelo menos quatro semanas antes de sua utilização e mantidos sob temperatura controlada (23°C), ciclos de iluminação de 12 horas e ração e água disponível *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da UFMG, sob o protocolo de renovação número 133/2009.

Vírus

O isolado de DENV sorotipo 2 P23085 foi obtido da Coleção de Vírus do Estado, Moscou, Russia e adaptado ao camundongo por passagens consecutivas em cérebro de neonatos e inoculação em camundongos imunocompetentes, até a observação de fenômenos patológicos consistentes com a dengue em humanos [96]. O processo de adaptação foi realizado em instalações de nível de biossegurança 3 (BSL-3) do Instituto SRC VB “Vector” em Koltsovo, Russia. Seqüências nucleotídicas dos genes E e NS1 da linhagem adaptada foram depositadas no GenBank sob o número de acesso AY927231 e apresentam 98% de similaridade com seqüências previamente depositadas do vírus.

Para os experimentos realizados nesta dissertação, estoques virais foram gerados a partir da propagação do DENV adaptado em células LLC-MK2 (Rim, macaco Rhesus, ATCC), em até duas passagens. O sobrenadante de cultura, constituído de meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*), suplementado com soro fetal bovino (SFB) em até 2% v/v, e DENV foi coletado, clarificado por centrifugação e congelado a -80°C até sua utilização. O título do estoque viral foi determinado por ensaio de formação de placas de lise (PFU) em células LLC-MK2 e expresso em PFU/ mL de sobrenadante e/ou em dose letal para 50% dos animais (LD₅₀). Para este propósito, grupos de 10 camundongos foram inoculados

intraperitonealmente com diluições seriadas do estoque viral e acompanhados na letalidade por até 14 dias pós-infecção (p.i.).

Infecção e desenho experimental *in vivo*

Para infecção com DENV, camundongos foram manipulados ao fluxo laminar e mantidos em estufas específicas para animais infectados com DENV. Para os ensaios de letalidade e inflamação/ parâmetros de doença, camundongos foram inoculados com 10 PFU de DENV-2, equivalente à 10LD₅₀, diluídos em 100µL de salina tamponada de fosfato (PBS).

O acompanhamento da letalidade foi realizado a cada 12 horas até o dia 14 ou 28 p.i.. Ao fim do ensaio, os camundongos sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical. Parâmetros inflamatórios foram avaliados ao dia 3 ou 5 p.i., anteriormente ao pico da infecção (dia 7 p.i.), no qual os animais apresentam sinais clínicos claros, derivados da infecção com DENV-2, e precede a morte da maioria dos mesmos. Os parâmetros inflamatórios ao pico da infecção, ao dia 7 p.i., já estão bem caracterizados e se encontram na introdução da dissertação (FIG.2). Todos os experimentos com camundongos foram acompanhados de grupos-controle WT não-infectados em paralelo. Camundongos CCR5^{-/-} não infectados foram avaliados para a produção de citocinas, atividade de MPO nos tecidos e parâmetros hematológicos, apresentando níveis normais e similares aos níveis encontrados em camundongos WT não infectados. Por questões de indisponibilidade de animais, o controle CCR5 não-infectado foi realizado somente em alguns experimentos.

Para os experimentos de bloqueio farmacológico do receptor CCR5, grupos de camundongos (n= 6-8) tratados com o antagonista misto dos receptores CCR5/CCR1, Met-RANTES (Merck-Serono, Suíça, gentilmente doado pela Dra. Amanda Proudfoot) na forma de pré-tratamento receberam 10µg da droga solubilizada em 0.1% albumina sérica bovina (BSA) em PBS diariamente, via subcutânea, no período de 1 dia antes da infecção ao dia 6 p.i.. Camundongos que receberam Met-RANTES na forma de pós-tratamento receberam a mesma dosagem, porém administrada do dia 3 p.i. ao dia 6 p.i.. Experimentos com o antagonista do receptor CCR5 UK-484900 (doado pelo Dr. Stephen Shaw, Pfizer Inc., Inglaterra) envolveram grupos de camundongos (n=8-10) submetidos aos mesmos períodos de pré- e pós- tratamentos. UK-484900 foi diluído em 50µL de

HCl 0.09 M e re-diluído em salina até a concentração útil para dosagem de 10mg/kg em 100µL, administrados duas vezes ao dia, via subcutânea. Todos os experimentos envolvendo tratamentos foram acompanhados dos grupos de animais não-infectados e infectados tratados com o veículo da droga.

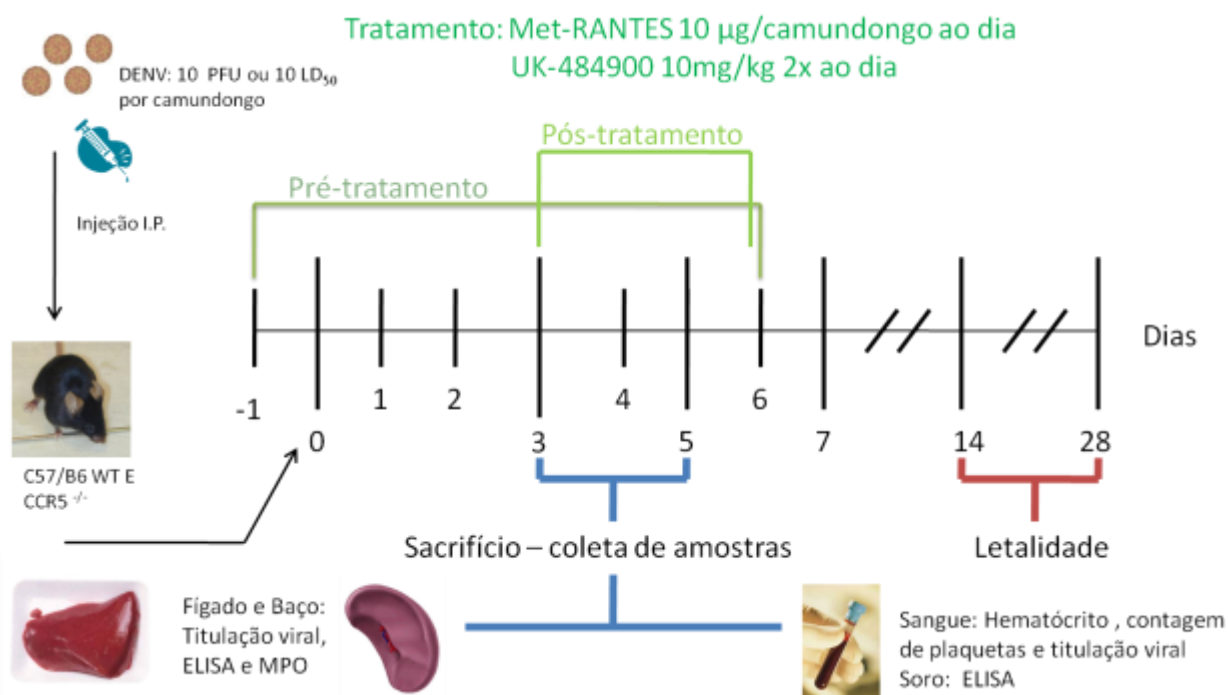


Figura 4 – Esquema representativo dos experimentos in vivo.

Camundongos WT ou CCR5^{-/-} foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ de DENV adaptado ao hospedeiro murino, diluídos em PBS. Animais foram sacrificados ao 3º e 5º dias pós-infecção (p.i.), para obtenção de amostras ou acompanhados até o 14º ou 28º dias p.i. para os ensaios de letalidade. Em verde, o período de administração e dose dos tratamentos com antagonistas do receptor CCR5.

Para o sacrifício e coleta de amostras, camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina (100mg/kg)/ xilasina (10mg/kg) em PBS para coleta de sangue, preparação de soro e análises hematológicas. Camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical para coleta do fígado e baço para posterior dosagem de citocinas, titulação viral e citometria de fluxo. As amostras foram congeladas a -80°C até o processamento e análise.

Desenho experimental *in vitro*

Para infecção com DENV *in vitro*, macrófagos peritoneais murinos foram coletados por lavagem peritoneal com solução de sacarose 0.34 M a 4°C, e plaqueados em placas de 6 poços a 1x10⁶ células por poço. As células foram incubadas por pelo menos 3 horas a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂, para aderência. As células foram então lavadas com DMEM, incubadas com DENV-2

adaptado a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1 ou 0.01 por uma hora, lavadas duas vezes com meio de cultura e mantidas com DMEM sem SFB, a 37°C, atmosfera de 5% CO₂ até a coleta das amostras. O sobrenadante da cultura e o extrato celular, obtido por choque-térmico da placa de cultura e ressuspensão em 700µL de DMEM, foram titulados em LLC-MK2 para determinação da carga viral separadamente nos *time-points* de 1, 12, 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção. Grupos experimentais submetidos a tratamentos com antagonistas de CCR5 ou toxina pertussis (PTX) foram lavados com DMEM após incubação com as drogas e também titulados em LLC-MK2 para determinação da carga viral. Cada amostra foi obtida de poços individuais com n mínimo de 3 por tempo/grupo e os experimentos foram acompanhados dos controles pertinentes.

O ensaio com o sistema celular GHOST foi realizado em colaboração com a profa. Dra. Luciana Arruda da Universidade federal do Rio de Janeiro. As células GHOST, derivadas de osteossarcoma humano, expressando ou não expressando os receptores de quimiocinas CCR5/CXCR4 e CCR3 foram infectadas com o isolado clínico de DENV-2 16681 a uma MOI de 5. Após lavagem, as células foram incubadas por 24 horas à 37°C, 5% CO₂. O sobrenadante de cultura e o extrato celular foram submetidos a PCR por tempo real e o resultado expresso em número de cópias do RNA viral por grupo.

Titulação Viral

Amostras de baço, fígado e sangue de camundongos, e amostras de culturas celulares foram submetidas à técnica de titulação por contagem de placas de lise em células LLC-MK2, já utilizada em outros trabalhos relacionados [90, 92-94]. Brevemente, amostras de órgãos foram preparadas por homogenização em cadinho e pistilo estéreis, seguindo a proporção de 10% peso/ volume em DMEM sem SFB. As suspensões de órgãos, sangue e amostras de cultura celular foram submetidas à diluição seriada, depositadas em placas de seis poços, contendo monocamadas de células LLC-MK2 95% confluentes, e incubadas a 37°C, 5% CO₂, por uma hora para adsorção, com agitações a cada 20 minutos. Após a adsorção, as placas foram cobertas com meio 199 suplementado com SFB a 2,5% v/v e carboximetilcelulose (CMC) a 1,5% p/v, e incubadas por sete dias. As culturas foram coradas com cristal violeta 1% p/v para contagem das placas de lise e os resultados expressos em PFU/

100mg de tecido, /100µL de sangue ou /mL de amostra. Todas as titulações, de órgãos e amostras de cultura, foram acompanhadas de seus grupos-controle internos positivos e negativos, e de amostras de grupos não-infectados.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa

Amostras de tecidos foram recolhidas de animais infectados em diferentes *time-points* de infecção e homogenizadas em TRIZOL com a ajuda de um macerador mecânico até a completa homogenização do tecido. Após homogenização e adição de clorofórmio, amostras foram centrifugadas e a fase aquosa recolhida para posterior precipitação do RNA mensageiro. A quantificação do RNA foi seguida da geração de cDNA a partir de uma reação de RT-PCR e a amostra resultante quantificada para a concentração de cDNA, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). Finalmente, as amostras de cDNA foram submetidas a uma reação de PCR quantitativo para determinação da expressão de CCR5, usando primers específicos para o CCR5 murino. As médias dos valores de *Cycle threshold* (Ct) foram normalizadas seguindo o método $\Delta\Delta Ct$ usando o gene 18S como gene de referência (*Housekeeping*). Os valores encontrados foram plotados e são expressos como aumento em vezes em comparação ao gene *housekeeping*. Foi utilizado um n = 4 por grupo por cada experimento realizado.

Parâmetros hematológicos

O sangue foi coletado dos camundongos anestesiados pelo plexo braquial, em microtubos previamente lavados em heparina. Plaquetas foram quantificadas ao microscópio ótico usando uma câmara de Neubauer. O índice de hematócrito foi determinado pela comparação das frações celular/ líquida de amostras sanguíneas centrifugadas em capilares de vidro heparinizados. Os resultados são expressos como número de plaquetas/ mm³ por mL de sangue e porcentagem de hematócrito.

Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Para análise de MPO, como índice indireto da acumulação de neutrófilos no tecido, amostras de 50 mg de baço ou fígado foram homogenizadas em 1 mL de tampão sódio/fosfato com 0.56% EDTA (p/v), centrifugadas e submetidas a 3 rodadas de choque-térmico para liberação da enzima ao sobrenadante nos tubos.

As amostras foram então plaqueadas no mínimo em duplicata, avaliadas quanto à conversão do substrato TMB e posterior alteração de cor nos poços. O resultado é expresso em unidades arbitrárias, após conversão e normalização dos valores de densidade óptica (OD), lidos ao comprimento de onda de 492 nm, em função de uma curva padrão Neutrófilos/ OD previamente preparada.

Quantificação dos níveis de citocinas

As concentrações de TNF- α , IFN- γ , IL-6, CXCL1/KC e IL-10 foram mensuradas por ELISA usando Kits comerciais e executados de acordo com as instruções do fabricante (*R&D Systems*, Minneapolis, Estados Unidos). As amostras de tecidos foram processadas como descrito para a determinação de atividade de MPO e o sobrenadante prévio ao choque térmico foi utilizado nos ensaios. Os valores dos ensaios de ELISA para uma determinada citocina/experimento foram conduzidos na mesma placa. Os resultados são expressos em pg/ mL do sobrenadante de amostra processada, correspondendo a pg da citocina por 50mg de tecido processado. O limite de detecção do ensaio é de 4 a 8 pg/mL de amostra.

Citometria de fluxo

Os baços foram coletados e homogeneizados usando maceradores de vidro temperado. A suspensão de células foi submetida à lise de hemácias por choque osmótico e plaqueada para marcação com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos. Anticorpos anti- CD4, CD8, CD69, CCR5, NK1.1, CD11b, CD11c, F4/80, controles de isótipo e estreptavidina conjugada a PE-Cy5 foram comprados das empresas *BD Pharmigen TM*, *eBiosciences* e *Biolegend*. A incubação com anticorpos durou 20 minutos, seguida de lavagem, incubação com estreptavidina conjugada a PE-Cy5 por 20 minutos, outra lavagem e fixação em formaldeído 4% v/v. As células marcadas com anticorpos foram adquiridas no citômetro *FACSCanto II* e analisadas no software *FlowJo (Tree Star)*.

Análise estatística e construção dos gráficos

Os resultados são expressos como média \pm o erro padrão da média. As diferenças foram comparadas usando a análise da variância (ANOVA) seguida do pós-teste Student-Newman-Keuls. Quando comparados somente 2 grupos (p.e. titulações de órgãos), foi usado o teste T de Student seguido do teste de Wilcoxon

quando a média de valores de algum dos grupos era igual a 0. As diferenças entre as curvas de letalidade foram calculadas usando o teste Log rank. As curvas de replicação em macrófagos foram comparadas usando a análise de variância entre as curvas originais ou retas derivativas do grau de inclinação da curvas. Os resultados cujo valor P foi <0.05 foram considerados significativos. Todos os dados são representativos de pelo menos dois experimentos com n aproximado de 10 animais para experimentos *in vivo* e n mínimo de 6 para experimentos *in vitro*. As análises foram realizadas e os gráficos montados com ajuda do software *Graph Pad PRISM 4.0*.

RESULTADOS

Camundongos CCR5^{-/-} são resistentes a diferentes sorotipos de DENV adaptado ao hospedeiro murino

Para confirmar a resistência do camundongo CCR5^{-/-} frente à dengue experimental, ensaios de letalidade foram repetidos com DENV-2, utilizado nos experimentos de descrição do fenótipo, e realizados com uma linhagem de DENV-3 adaptada ao hospedeiro murino (FIG.5).

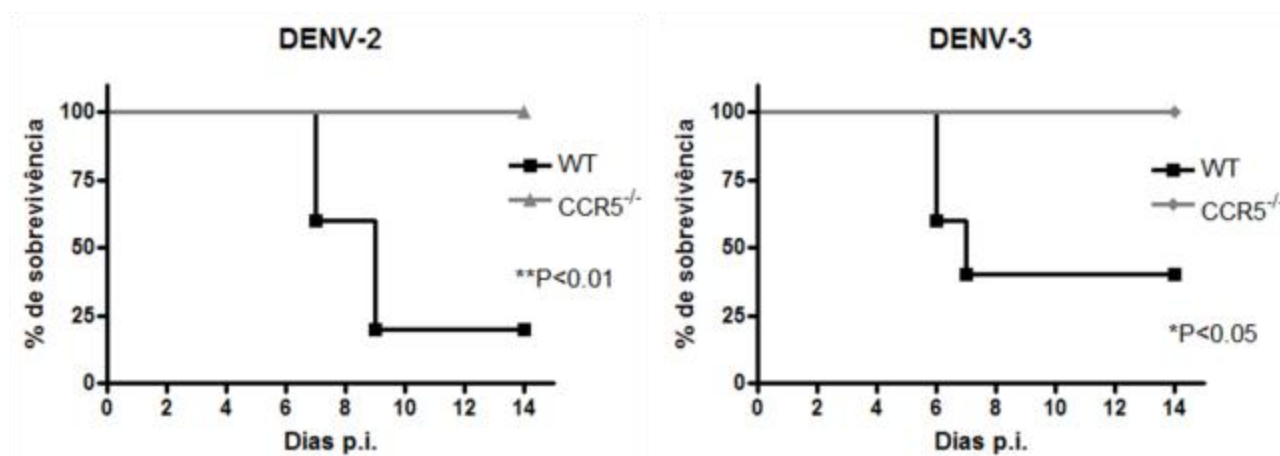


Figura 5 - Camundongos CCR5^{-/-} são resistentes a diferentes sorotipos de DENV adaptado.

Camundongos WT ou CCR5^{-/-} foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ de DENV adaptado ao hospedeiro murino, diluídos em PBS. Animais foram acompanhados até o 14º dia p.i. e então sacrificados ao fim do ensaio. A diferença estatística entre as curvas é definida por p<0.05 (DENV-3) e p<0.01 (DENV-2). Para cada curva de letalidade, n = 6-8 animais por grupo.

Os resultados confirmaram a resistência do camundongo CCR5^{-/-} ao inoculo letal por DENV-2 (FIG.5 esquerda). De forma similar, a infecção por DENV-3 não causou mortalidade no grupo CCR5^{-/-} no tempo observado, em contraste com a mortalidade observada no grupo WT, em aproximadamente 60% (FIG.5 direita). Assim, a resistência de camundongos CCR5^{-/-} a mortalidade associada à infecção por DENV-2 é reproduzida em infecções por DENV-3, tratando-se de um vírus de sorotipo diferente e adaptado ao camundongo de forma independente do DENV-2. Os próximos experimentos foram realizados exclusivamente com DENV-2, dada a similaridade entre as infecções, por possuir maior experiência e por se tratar de um modelo melhor estabelecido [90, 94].

Explorando o tempo e o inóculo viral na sobrevivência de camundongos CCR5^{-/-} frente à infecção experimental por DENV-2

Confirmado o fenótipo de proteção na dengue experimental, conferida pela deficiência no receptor CCR5, foi testada a hipótese dos camundongos CCR5^{-/-} apresentarem uma lenta progressão da doença, que acarretaria uma mortalidade atrasada em relação ao grupo WT. Para tal, realizou-se outro ensaio de letalidade com grupos de camundongos WT e CCR5^{-/-} observados até o 28º dia pós-infecção (p.i.) (FIG.6A). Apesar de uma mortalidade menor do que o esperado para o grupo WT, por volta de 45% frente ao inóculo de 10 PFU de DENV-2, foi observado que o grupo CCR5^{-/-} é completamente protegido até o 28º dia p.i.. Portanto, não há mortalidade fora dos períodos inicialmente observados e a proteção da mortalidade no grupo CCR5^{-/-} é verídica.

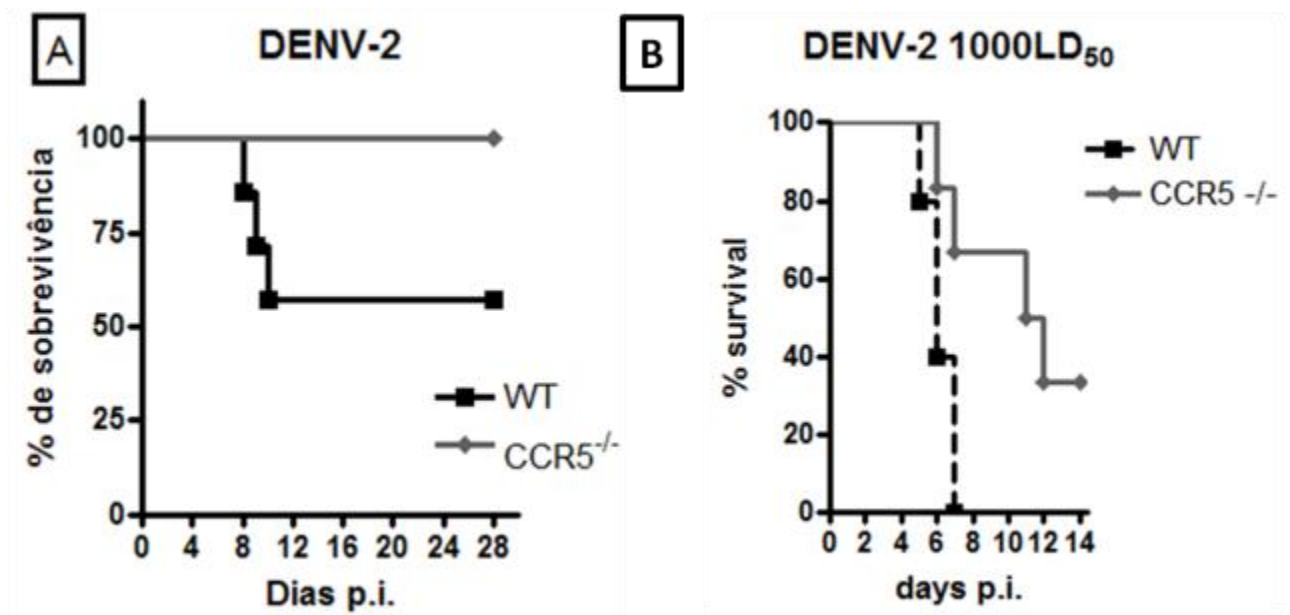


Figura 6 - Explorando o tempo e o inóculo viral na sobrevivência de camundongos CCR5^{-/-} frente à infecção experimental por DENV-2.

Camundongos WT ou CCR5^{-/-} foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ (A) ou 1000 PFU/1000 LD₅₀ de DENV-2 adaptado ao camundongo, diluídos em PBS. Animais foram acompanhados até o 28º ou 14º dia p.i. e então sacrificados ao fim do ensaio. A diferença estatística entre as curvas é definida por p=0.11 (A) e p<0.07 (B). Para cada curva de letalidade, n = 5-7 animais por grupo.

Somente foi observada mortalidade no grupo CCR5^{-/-} quando este foi inoculado com uma quantidade ainda maior de DENV-2 (Fig.6B). O inóculo de 1000 LD₅₀ ou 1000 PFU por animal causou aproximadamente 40% de mortalidade nos

animais CCR5^{-/-}, sendo novamente mais resistentes que o grupo WT, que sucumbiu a este inóculo aos 6^o e 7^o dias p.i., comprovando a gravidade da infecção.

UK-484900 protege camundongos WT da mortalidade decorrente da infecção por DENV-2 quando administrado previamente à infecção

A participação do CCR5 no desenvolvimento da dengue experimental é evidente e a deficiência em expressá-lo é muito protetora. A eficácia do tratamento pré-infecção com o antagonista Met-RANTES em camundongos WT, capaz de reproduzir a proteção encontrada no camundongo CCR5^{-/-} é um achado marcante, que indica que o bloqueio farmacológico do CCR5 pode ser uma alternativa profilática para controle da dengue. O fármaco Met-RANTES é um antagonista protéico do receptor CCR5. A utilização de outro antagonista, de composição e características farmacológicas diferentes, capaz de reproduzir os dados obtidos com o tratamento com Met-RANTES, não só corrobora com a participação do CCR5 na doença como fortalece a perspectiva do desenvolvimento de um tratamento.

O antagonista do receptor CCR5, UK-484900, desenvolvido pela empresa *Pfizer*, é um análogo do composto Maraviroc, um antagonista de CCR5 disponível comercialmente, criado para tratamento de infecções por HIV. Trata-se de uma molécula de baixo peso molecular e baixa lipofilia, do grupo das imidazilpiperidinas tropânicas. Desta forma, foi realizado um ensaio no qual camundongos WT receberam a droga UK-484900 previamente (FIG.7A) ou após a infecção (FIG.7B) por DENV-2 (pré- e pós-tratamento, respectivamente). As curvas de letalidade indicam que, de forma similar aos experimentos com Met-RANTES, somente o pré-tratamento (FIG.7A) com o antagonista UK-484900 foi eficaz em proteger os animais da mortalidade decorrente da infecção (Fig.7A), apresentando aproximadamente 70% de sobrevivência comparada a 20% de sobrevivência no grupo WT infectado não tratado (WT). Em contraste, os animais submetidos ao pós-tratamento (FIG.7B) sucumbiram à infecção de forma similar ao grupo WT. Grupos controle, compostos por animais não-infectados e por animais infectados tratados com o veículo da droga foram realizados em paralelo e não indicaram qualquer efeito adverso (dados não mostrados).

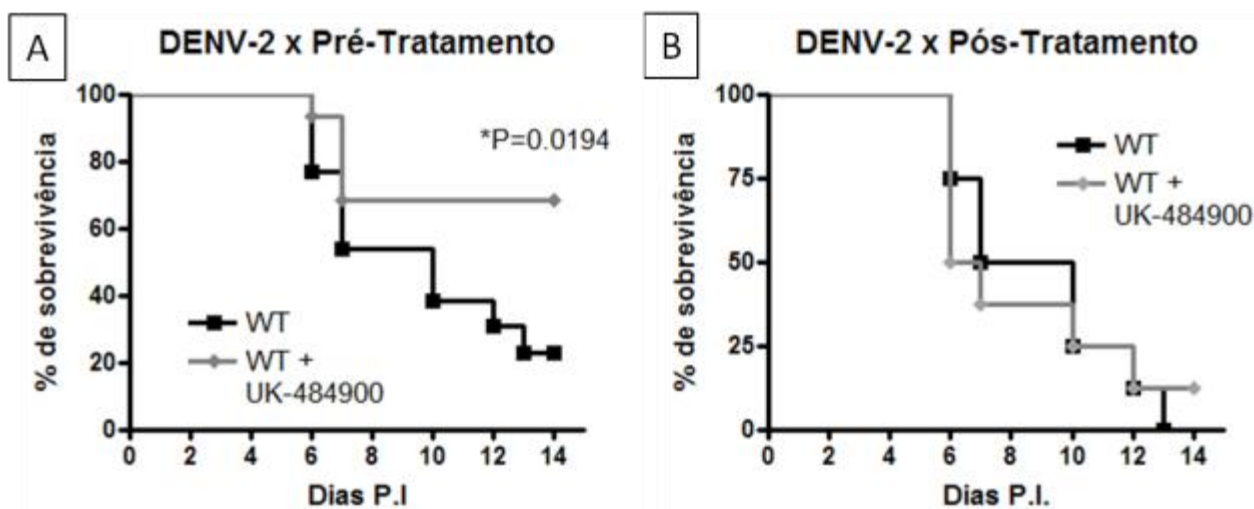


Figura 7 - Pré-tratamento com UK-484900, mas não o pós-tratamento, protege camundongos WT contra infecção letal por DENV-2

Camundongos WT foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ de DENV-2 adaptado ao camundongo, diluídos em PBS. Camundongos submetidos a tratamentos receberam 10 mg/kg de UK-484900 duas vezes ao dia, via subcutânea. O grupo submetido ao pré-tratamento recebeu a droga 1 dia antes da infecção ao 6º dia p.i. (A) e o grupo submetido ao pós-tratamento recebeu a droga do dia 3 ao dia 6 p.i.. Animais foram acompanhados até o 14º dia p.i. e então sacrificados ao fim do ensaio. A diferença estatística entre as curvas é definida por p=0.0194 (A) e p=0.99 (B). Para cada curva de letalidade, n = 10-15 animais por grupo.

Assim, o tratamento com outro antagonista do receptor CCR5 é capaz de reproduzir a proteção observada no camundongo CCR5^{-/-}, bem como a proteção obtida com o pré-tratamento com Met-RANTES. Novamente, a eficácia restrita ao pré-tratamento, ou seja, ao bloqueio do receptor em períodos prévios à infecção, sugere a participação do receptor CCR5 nos momentos iniciais da infecção, cruciais para o desenvolvimento da doença.

A deficiência na expressão do receptor CCR5 não interfere na entrada do DENV-2 nas células

A marcante resistência do camundongo CCR5^{-/-} contra a infecção experimental por DENV, notada pela reduzida carga viral, ausência de doença e de mortalidade; e o sucesso do pré-tratamento com antagonistas do receptor, sugere o envolvimento do receptor CCR5 nas fases iniciais da infecção. Atualmente, fagócitos mononucleares residentes são considerados os alvos primários do DENV na infecção do homem, em função de sua localização propícia ao encontro com o vírus (por exemplo, na pele) e pela expressão de moléculas associadas à ligação do DENV à célula [44-46, 97]. As células dendríticas, monócitos e macrófagos expressam CCR5 [98] e, considerando o papel deste receptor como co-receptor

para o HIV, foi gerada a hipótese de que a deficiência de CCR5 afetaria o processo de infecção diretamente.

Inicialmente, para testar a hipótese de participação do receptor CCR5 na entrada viral, foi utilizado o sistema celular GHOST. Este sistema celular consiste em uma linhagem celular derivada de um osteossarcoma humano, manipulado geneticamente para a expressão de CD4 e dos co-receptores de entrada do HIV: os receptores de quimiocinas CCR3, CXCR4 e CCR5 [99]. O ensaio foi baseado na infecção de linhagens celulares GHOST, expressando ou não os receptores de quimiocinas, para determinar se a ausência do receptor CCR5 interferiria na entrada do DENV-2 nas células. O isolado clínico humano DENV-2 16681 foi utilizado para infecção das culturas e foi observado que essa linhagem viral é capaz de infectar as

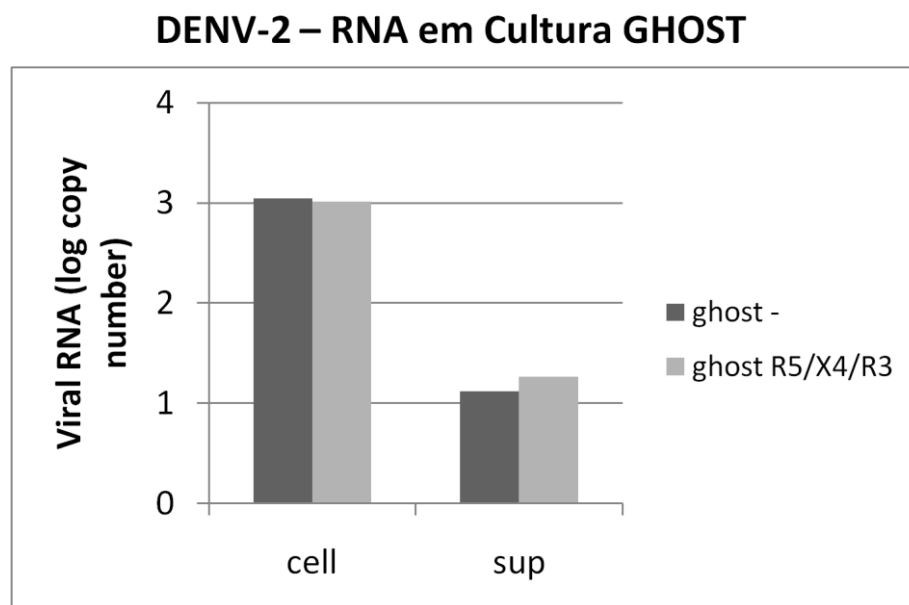


Figura 8 - O receptor CCR5 não está envolvido na entrada do DENV-2 16681 em células GHOST

Células GHOST, expressando CCR5 e outros receptores de quimiocinas (ghost R5/X4/R3) ou não expressam (ghost -) foram infectadas com o isolado clínico DENV-2 16681 a uma MOI de 5. O extrato celular da cultura (cell) e o sobrenadante (sup) foram submetidos a um PCR para amplificação do RNA do DENV-2 16681 e o resultado expresso em número de cópias de RNA viral por grupo/linhagem celular.

células GHOST (FIG.8), notada pela presença e amplificação do RNA viral no sobrenadante de cultura (sup) e nas células (cell) expressando CCR5/CXCR4/CCR3 (ghost R5/X4/R3). As células negativas para expressão dos co-receptores do HIV (ghost -) e o respectivo sobrenadante de cultura também possuíam RNA de DENV-2 16681, amplificado em quantidades similares ao grupo ghost -, sugerindo que o

CCR5 (e os outros receptores de quimiocinas expressos) não estão envolvidos com o processo de entrada do DENV-2 neste tipo celular.

Utilizando de outra abordagem, foi desenvolvido um sistema *in vitro* de infecção de macrófagos para explorar possíveis relações entre o receptor CCR5 e o DENV. Em função da via de infecção intraperitoneal no modelo animal, e da facilidade de cultivo e manipulação, macrófagos residentes no peritônio de camundongos foram escolhidos para o estabelecimento de culturas celulares primárias. Obtidos por lavagem peritoneal sem exposição prévia a um antígeno, macrófagos de camundongos WT foram plaqueados e infectados com o DENV-2 adaptado em diferentes multiplicidades de infecção (MOI) para avaliar a progressão da infecção. Como mostrado na FIG.9, a titulação viral do sobrenadante e do extrato celular das culturas primárias indica o aumento de partículas virais viáveis de DENV ao longo do tempo e da MOI aplicada. O extrato celular (FIG.9A) apresenta maior carga viral relativa ao sobrenadante de

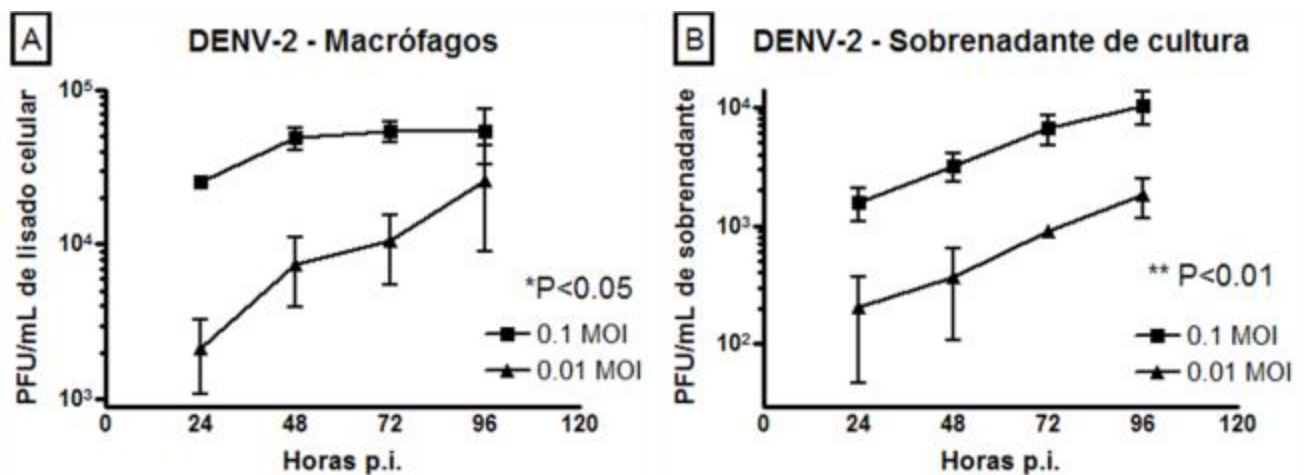


Figura 9 - Padronização do sistema *in vitro* de infecção de macrófagos peritoneais murinos por DENV

Macrófagos peritoneais murinos foram coletados de camundongos WT por lavagem peritoneal em solução 0,34M de sacarose. Após plaqueamento, as células foram infectadas com DENV-2 adaptado a uma MOI de 0,1 ou 0,01. Amostras do lisado celular (A) e do sobrenadante de cultura (B) foram coletadas de 24 a 96 horas pós-infecção e tituladas em células LLC-MK2 para determinação da carga viral. Os resultados são expressos como PFU/mL do lisado celular ou do sobrenadante de cultura em função do tempo. As diferenças entre as curvas são representadas por $P < 0.05$ para (A) e $P < 0.01$ (B) referentes à variação relacionada ao tempo e à MOI, independentemente.

cultura (FIG.9B) e foi escolhido como amostra principal para alguns dos experimentos envolvendo cultura de macrófagos peritoneais. Da mesma forma, a MOI de 0.01 foi mais utilizada, em função da cinética de aumento da carga viral em função do tempo, tanto para o extrato celular quanto para o sobrenadante de cultura.

Com base na técnica empregada nas curvas de replicação em macrófagos peritoneais, outro ensaio foi realizado para determinar se o receptor CCR5 participa no processo de entrada viral. Macrófagos peritoneais oriundos de camundongos WT foram plaqueados e tratados com CCL5/RANTES ou toxina pertussis (PTX) previamente à infecção por DENV-2. O tratamento com CCL5/RANTES foi empregado com o objetivo de causar a internalização do receptor CCR5, tornando-o indisponível na superfície celular no momento da adsorção, enquanto o tratamento com PTX buscou bloquear a sinalização do receptor, que é acoplado à proteína G (FIG.10).

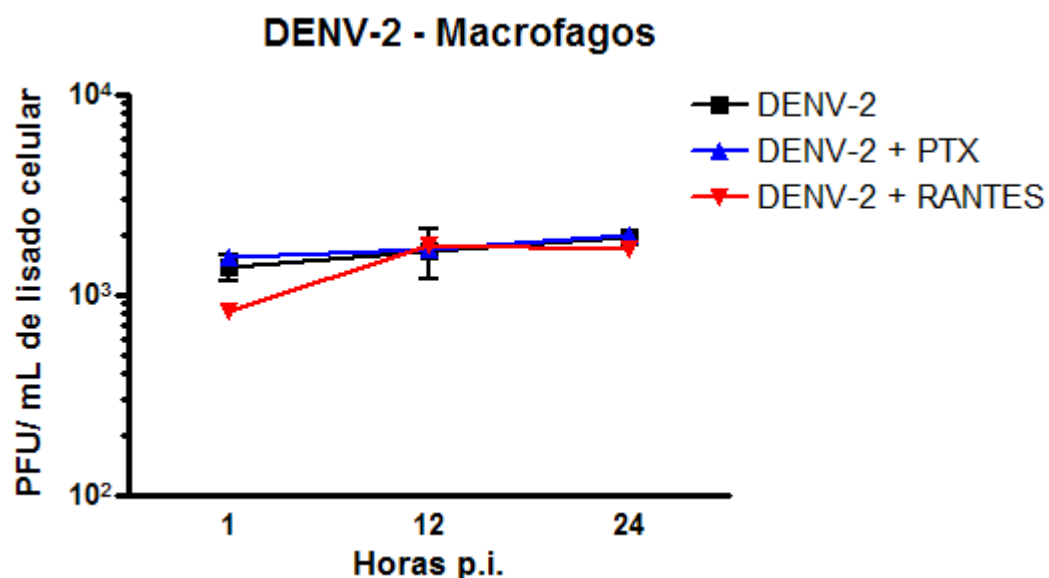


Figura 10 - O receptor CCR5 não está envolvido na entrada do DENV-2 adaptado ao camundongo em macrófagos

Macrófagos peritoneais murinos foram coletados de camundongos WT por lavagem peritoneal em solução 0,34M de sacarose. Após plaqueamento, as células foram incubadas com (RANTES) recombinante ou toxina pertussis (PTX) por 1 hora. Após o tratamento, as células foram lavadas e infectadas com DENV-2 adaptado a uma MOI de 0,01. Amostras do lisado celular foram coletadas imediatamente após a adsorção a 24 horas pós-infecção e tituladas em células LLC-MK2 para determinação da carga viral. Os resultados são expressos como PFU/mL do lisado celular em função do tempo.

Em função do objetivo do experimento, que é investigar se os tratamentos influenciam a entrada viral, foram escolhidos *time-points* iniciais na infecção, de imediatamente após a adsorção viral ao período de 24 horas p.i. O experimento demonstrou que não há diferença na carga viral entre os grupos em nenhum dos momentos observados. Logo, o pré-tratamento das culturas com ligante CCL5/RANTES ou o com a toxina PTX não interferem no processo de entrada do DENV-2 em macrófagos. Juntamente com os resultados do experimento com células GHOST, este experimento indica que o receptor CCR5 não está envolvido

com a entrada do DENV nas células e, portanto, indica que a resistência do camundongo CCR5^{-/-} à infecção por DENV não está relacionada a problemas no processo de entrada viral.

A deficiência no receptor CCR5 atrasa a replicação do DENV em macrófagos

O papel do receptor CCR5 em infecções virais não é restrito ao seu papel como co-receptor do HIV. Baseado no fato que o receptor CCR5 determina a permissividade celular a infecções por *Vaccinia vírus* através de sua sinalização intracelular [86], foi investigada a possibilidade do receptor CCR5 também influenciar a permissividade celular ao DENV. Desta forma, um ensaio *in vitro* de infecção por DENV-2 foi realizado, incluindo macrófagos obtidos de camundongos WT e CCR5^{-/-}, com o objetivo de determinar a replicação viral nos dois grupos de células (FIG.11). Após a infecção com DENV-2, amostras de cultura foram coletadas em até 96 horas p.i. e analisadas em função da quantidade de partículas infectivas geradas.

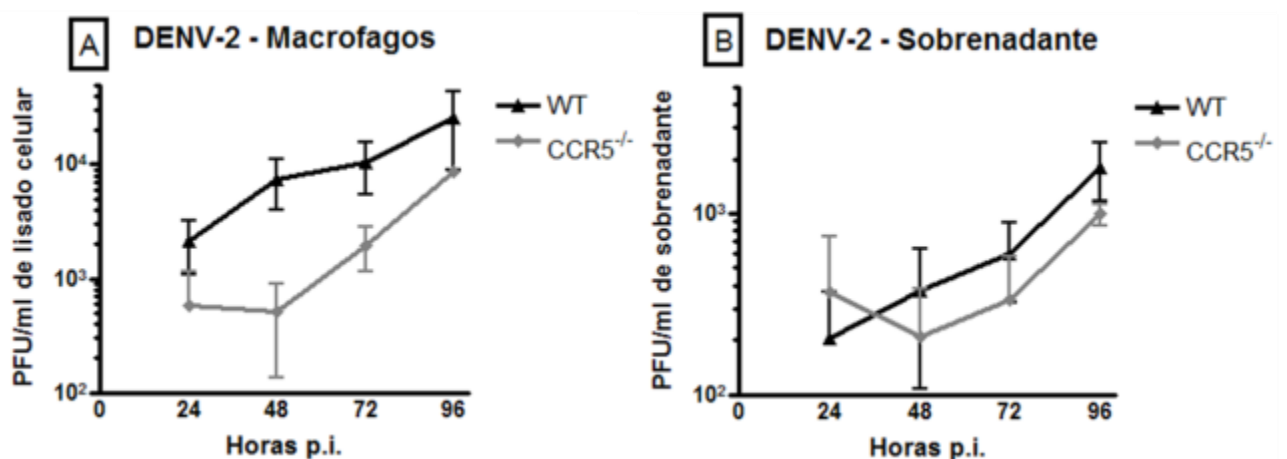


Figura 11 - DENV-2 se replica lentamente em células CCR5^{-/-}

Macrófagos peritoneais murinos foram coletados de camundongos WT e CCR5^{-/-} por lavagem peritoneal em solução 0,34M de sacarose. Após plaqueamento, as células foram lavadas e infectadas com DENV-2 adaptado a uma MOI de 0,01. Amostras do lisado celular (A) e sobrenadante de cultura (B) foram coletadas de 24 a 96 horas pós-infecção e tituladas em células LLC-MK2 para determinação da carga viral. Os resultados são expressos como PFU/mL do lisado celular ou do sobrenadante em função do tempo.

O ensaio de placas de lise revelou uma reduzida carga viral em amostras de cultura originadas dos macrófagos CCR5^{-/-} nos períodos analisados em comparação ao grupo WT. De forma marcante, a quantidade de partículas infectivas no extrato celular de macrófagos CCR5^{-/-} (FIG.11A), onde a diferença é evidente, aumenta somente a partir de 48 horas após a infecção, ponto no qual a diferença de cargas virais entre os grupos é de aproximadamente 10 vezes. Ainda, em células CCR5^{-/-}, o

acúmulo da progênie viral 72 horas após infecção é equivalente à quantidade encontrada em células WT no período de 24 horas p.i.. Para confirmação da expressão do receptor CCR5 nas células, macrófagos peritoneais recolhidos dos camundongos WT e CCR5^{-/-} foram submetidos a um ensaio de PCR quantitativo. Este ensaio confirmou não só que as células WT expressam níveis basais de CCR5 em cultura como que as células de camundongos CCR5^{-/-} são, de fato, deficientes para a expressão do receptor, não possuindo mRNA que corresponda à proteína (dados não mostrados). Ensaio de viabilidade celular com o reagente MTT confirmaram que a viabilidade das culturas de macrófagos WT e CCR5^{-/-} é similar e, portanto, não é responsável pelas variações de carga viral entre os grupos experimentais (dados não mostrados).

Para analisar as curvas de replicação viral em macrófagos WT e CCR5^{-/-}, representadas na FIG.11, os valores de inclinação das curvas a cada *time-point* observado foram plotados gerando retas derivativas representativas do experimento. A análise da inclinação das curvas revelou que os grupos de amostras WT e CCR5^{-/-} são estatisticamente diferentes (FIG.12), confirmando o efeito da deficiência de CCR5 na replicação do DENV-2 em macrófagos.

Curvas de replicação viral em macrófagos de camundongos WT e CCR5^{-/-} também foram executadas com utilizando uma MOI de 0.1, e apresentaram perfis similares aos observados no experimento com a MOI de 0.01 (FIG.11), com diferenças de até uma casa logarítmica (\log_{10}) na carga viral entre amostras de extrato celular WT e CCR5^{-/-} até as 48 horas p.i.. No entanto, a maior carga viral em experimentos com a MOI de 0.1 satura a capacidade de evidenciar as diferenças entre os tempos p.i.(dados não anexados).

Logo, enquanto partículas virais viáveis são continuamente geradas no interior dos macrófagos WT, a replicação em células CCR5^{-/-} é estagnada até 48 horas após infecção. Em conjunto, essas observações são consistentes com um atraso na replicação do DENV-2 no grupo CCR5^{-/-}.

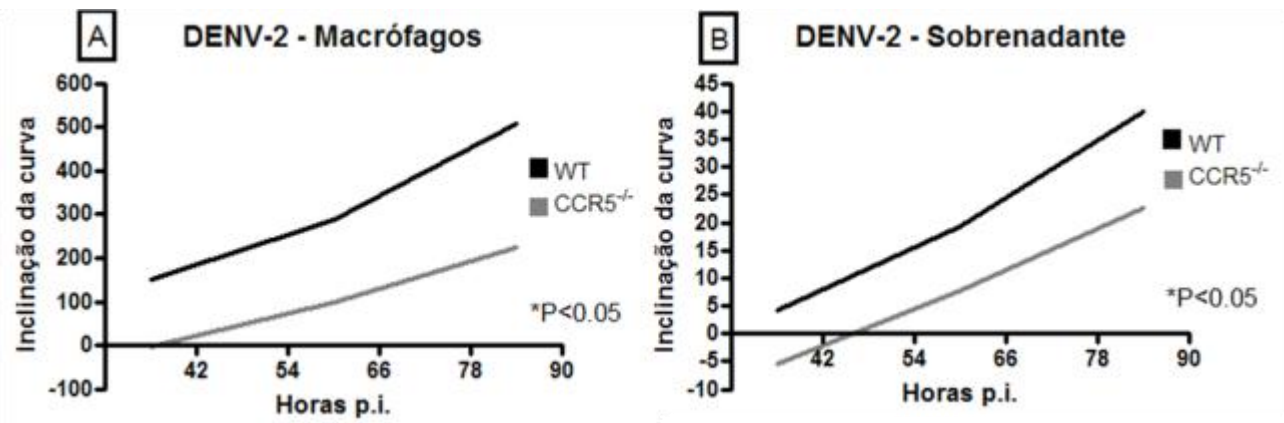


Figura 12 - Análise da inclinação das curvas de replicação celular em macrófagos WT e CCR5^{-/-}

As curvas de replicação viral em macrófagos peritoneais de camundongos WT (preto) e CCR5^{-/-} (cinza), representadas na figura 11, foram derivadas em função de sua inclinação ao longo do tempo. Os gráficos representam a derivativa das curvas de lisados celulares (A) e sobrenadante de cultura (B). Os resultados são expressos como retas referentes aos valores de inclinação das curvas das figuras 11A e 11B, respectivamente. As diferenças entre as retas são expressas por $P < 0.05$ em ambos os gráficos.

Para reproduzir este resultado, o bloqueio farmacológico do receptor CCR5 foi empregado na tentativa de atrasar a replicação do DENV-2 em macrófagos WT. De forma similar aos experimentos que descartaram a participação do CCR5 na entrada viral, macrófagos peritoneais de camundongos WT foram tratados previamente à infecção com Met-RANTES ou PTX e avaliados em função da carga viral até 96 horas p.i. (FIG.13). Foi observado o aumento da quantidade de vírus no sobrenadante de cultura de células WT não-tratadas ao longo do tempo, com pico em 72 horas p.i. Grupos pré-tratados com Met-RANTES ou PTX apresentaram carga viral reduzida comparada ao grupo WT não-tratado. De forma similar aos grupos experimentais com células CCR5^{-/-}, o grupo pré-tratado com Met-RANTES apresentou um atraso na geração da progênie viral, apresentando inclinação positiva na curva (representativo do aumento da carga viral) somente a partir das 48 horas p.i.. De forma interessante, o pré-tratamento com PTX prejudicou a replicação viral, impedindo o aumento da carga viral ao longo dos tempos observados.

Logo, o pré-tratamento com Met-RANTES é capaz de reproduzir o atraso na replicação de DENV-2 em células CCR5^{-/-}. O pré-tratamento com PTX é capaz de prevenir o aumento da carga viral nas amostras, a níveis similares aos encontrados no grupo pré-tratado com Met-RANTES.

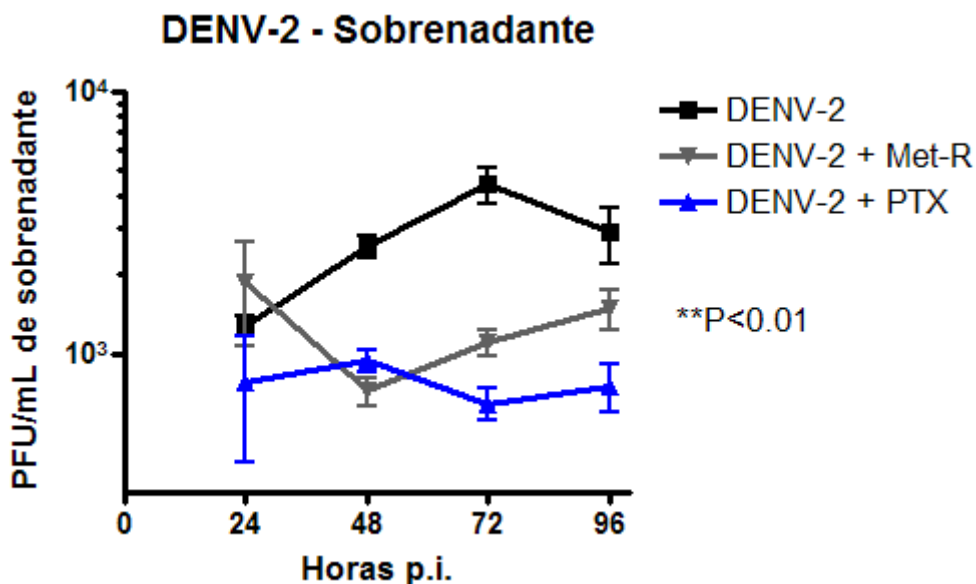


Figura 13 - Pré-tratamento com Met-RANTES ou PTX prejudicam a replicação viral em células WT.

Macrófagos peritoneais murinos foram coletados de camundongos WT por lavagem peritoneal em solução 0,34M de sacarose. Após plaqueamento, as células foram incubadas com Met-RANTES (Met-R) ou toxina pertussis (PTX) por 1 hora. Após o tratamento, as células foram lavadas e infectadas com DENV-2 adaptado a uma MOI de 0,1. (Figura 13, continuado) Amostras do lisado celular foram coletadas de 24 a 96 horas pós-infecção e tituladas em células LLC-MK2 para determinação da carga viral. Os resultados são expressos como PFU/mL do sobrenadante em função do tempo. A diferença entre as curvas é significativa e representada por $P < 0.01$.

Apesar de não influenciar a entrada do DENV-2 em macrófagos, o receptor CCR5 é necessário no processo de replicação nestas células. Em outras palavras, DENV-2 replica de forma lenta, atrasada, em macrófagos CCR5^{-/-} em comparação a macrófagos WT. Este fenômeno de atraso na replicação pode ser reproduzido pelo tratamento com Met-RANTES previamente à infecção. A sinalização intracelular do receptor CCR5 também parece estar envolvida, sendo que o tratamento com PTX, capaz de bloquear a sinalização de GPCRs, também impediu o aumento da carga viral. Assim, o receptor CCR5 parece ser requerido em momentos iniciais no processo de replicação viral em macrófagos, considerando que a deficiência ou o bloqueio do receptor com o antagonista prejudica temporariamente a proliferação do DENV na célula hospedeira e exemplificado no fato que o crescimento da progênie viral é retomado após as 48 horas iniciais de estagnação.

Camundongos CCR5^{-/-} apresentam reduzida carga viral nos tecidos nas fases iniciais da infecção por DENV-2

O impacto da deficiência no receptor CCR5 para a replicação do DENV-2 em macrófagos *in vitro* levou à consideração do que esse fenômeno acarretaria *in vivo*,

no modelo animal em camundongos. Para determinar como o atraso na replicação viral em macrófagos influenciaria a progressão da infecção, camundongos WT e CCR5^{-/-} foram inoculados com DENV-2 e sacrificados em fases iniciais de infecção, aos 3^o e 5^o dias p.i., que precedem o pico da doença.

Considerando a carga viral não-detectável ou muito reduzida nos órgãos de camundongos CCR5^{-/-} ao 7^o dia p.i., havia a necessidade de averiguar se de fato a infecção por DENV-2 se estabelecia no animal deficiente. A titulação viral por contagem de placas de lise ao 3^o e 5^o dia p.i. de amostras de baço e fígado, órgãos muito afetados na doença humana e no modelo animal, confirmaram o estabelecimento da infecção em camundongos CCR5^{-/-} (FIG.14), pela detecção de títulos virais significativos ao 5^o dia p.i. em seus tecidos. Como esperado, foi detectada elevada carga viral nos tecidos de camundongos WT, cujo nível aumenta ao decorrer dos dias de infecção analisados (3^o e 5^o) estendendo-se a títulos ainda maiores no pico da infecção (7^o dia), quando a maioria dos camundongos morrem (FIG.1 e 2).

No entanto, a presença e o aumento da carga viral nos tecidos dos camundongos WT e CCR5^{-/-} diferem em um ponto crucial. Desde a análise inicial ao 3^o dia p.i., os camundongos CCR5^{-/-} apresentam reduzida carga viral quando comparados aos camundongos WT (FIG.14). Ao dia 3 p.i., partículas virais viáveis são indetectáveis nos tecidos de camundongos CCR5^{-/-}, sendo encontradas no fígado e baço somente ao 5^o dia p.i., em contraste aos 10³ a 10⁴ PFU de DENV-2 encontradas nas amostras de tecido de camundongos WT (FIG.14 coluna esquerda) já ao 3^o dia p.i.. Ao 5^o dia p.i., a redução no título viral no baço de camundongos CCR5^{-/-} é estatisticamente significativa quando comparada ao título viral no baço de camundongos WT, juntamente com os valores encontrados no fígado, que seguem a mesma tendência de redução em relação ao grupo WT (FIG.14, coluna direita). Amostras de sangue de ambos os grupos experimentais foram tituladas e apresentam carga viral indetectável nos tempos observados (dados não mostrados).

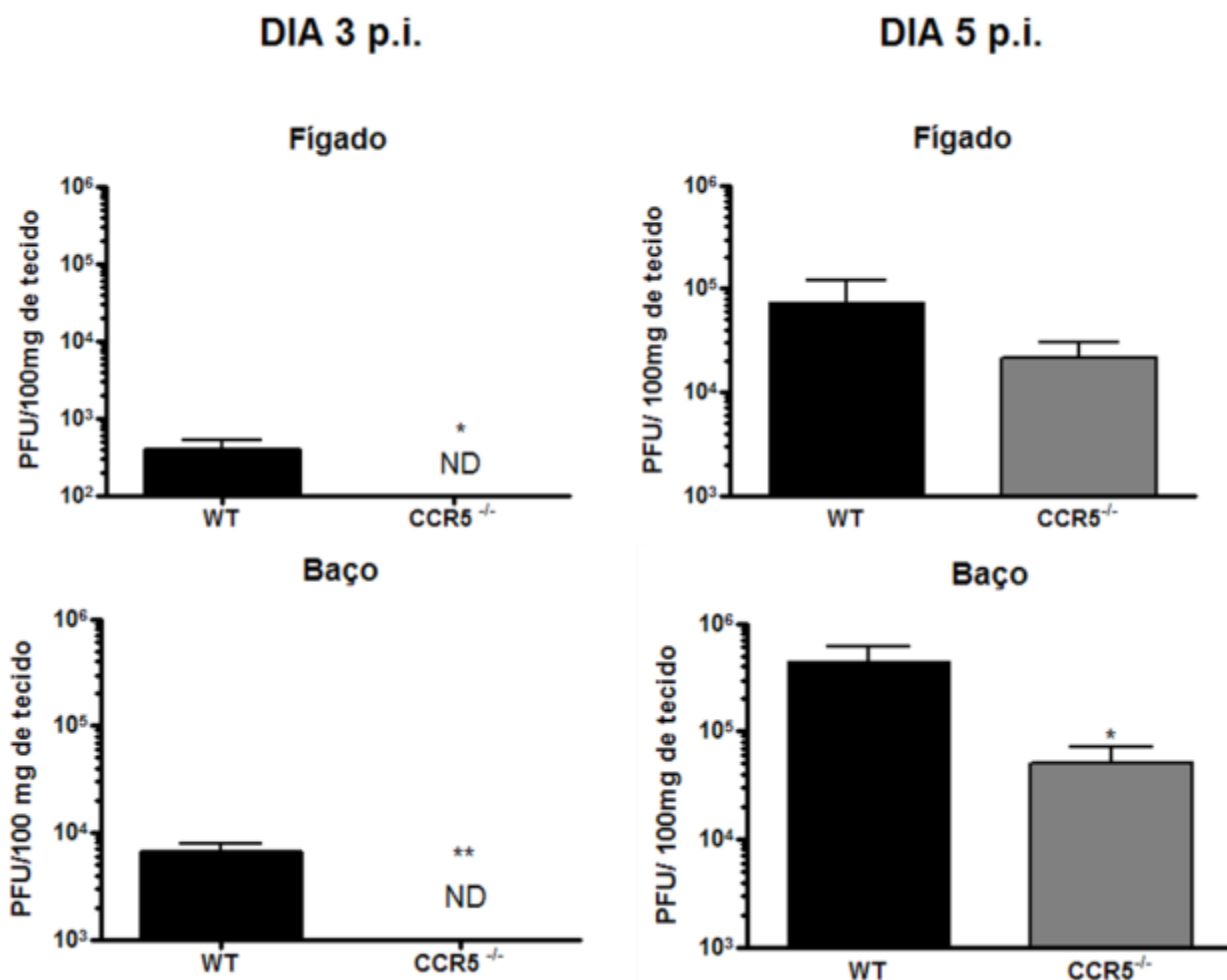


Figura 14 - Camundongos CCR5^{-/-} apresentam reduzida carga viral nos tecidos nas fases iniciais de infecção por DENV-2

Camundongos WT ou CCR5^{-/-} foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ DENV-2 adaptado ao camundongo, diluídos em PBS. Animais foram sacrificados aos dias 3^o (coluna esquerda) e 5^o p.i. (coluna direita) para obtenção de amostras de fígado e baço posteriormente submetidas a titulação viral em células LLC-MK2. Os resultados são expressos como PFU/ 100 mg de tecido processado. A diferença estatística entre as colunas é definida por P<0.05 (*) e p<0.01 (**). Para cada experimento, n = 4-7 animais por grupo.

A carga viral indetectável ou reduzida nos tecidos do grupo CCR5^{-/-} em tempos iniciais de infecção no modelo animal, em comparação ao grupo WT, corrobora com os resultados *in vitro* obtidos com as curvas de replicação viral em macrófagos. O atraso na replicação do DENV-2 em macrófagos CCR5^{-/-} existe no modelo animal e pode ser visualizado pela reduzida carga viral no baço e fígado de camundongos CCR5^{-/-} ao 3^o dia p.i., sendo necessários cinco dias de infecção para que a progênie viral alcance títulos virais comparáveis aos títulos virais do grupo WT, porém ainda reduzidos. A dependência do DENV no receptor CCR5 para replicação prejudica o acúmulo e disseminação do vírus nos tecidos do camundongo CCR5^{-/-} e pode explicar o mecanismo de resistência deste animal à infecção por DENV.

Camundongos CCR5^{-/-} não desenvolvem a doença associada à infecção por DENV-2

Na dengue, a resposta inflamatória excessiva é um componente, se não o principal, que conduz ao agravamento da doença e que a caracteriza. No modelo animal, a resposta inflamatória excessiva também está associada a um quadro grave da doença, comumente levando ao choque hipovolêmico e à morte dos animais. Ao 7º dia pós-infecção, o camundongo CCR5^{-/-} não apresenta quaisquer parâmetros inflamatórios ou alterações hematológicas e sua sobrevivência é completa frente ao inóculo letal por DENV-2. Para determinar como o receptor CCR5 participa na resposta inflamatória desencadeada pela infecção, grupos de camundongos WT e CCR5^{-/-} foram novamente inoculados com DENV-2 e avaliados em seu perfil inflamatório/ hematológico em fases iniciais da infecção.

A análise dos parâmetros hematológicos de camundongos WT e CCR5^{-/-} aos dias 3 e 5 p.i., pela contagem de plaquetas e mensuração do índice de hematócrito, demonstrou que ao 3º dia p.i. nenhum dos grupos apresenta quaisquer alterações hematológicas, tais como plaquetopenia ou hemoconcentração (FIG.15 coluna esquerda). Ao 5º dia p.i., camundongos CCR5^{-/-} apresentam contagem de plaquetas e níveis de hematócrito normais, similares aos níveis encontrados em camundongos não infectados (NI). De forma contrária, camundongos WT já apresentam uma piora na doença, observada pela queda no número de plaquetas e aumento do índice de hematócrito, consistentes com fases prévias à plaquetopenia e hemoconcentração graves apresentadas por esse grupo no pico da infecção (FIG.15 coluna direita). Por se tratar de um momento anterior na infecção, no qual os sinais da doença são ainda reduzidos, outros parâmetros inflamatórios não foram mensurados ao 3º dia p.i.

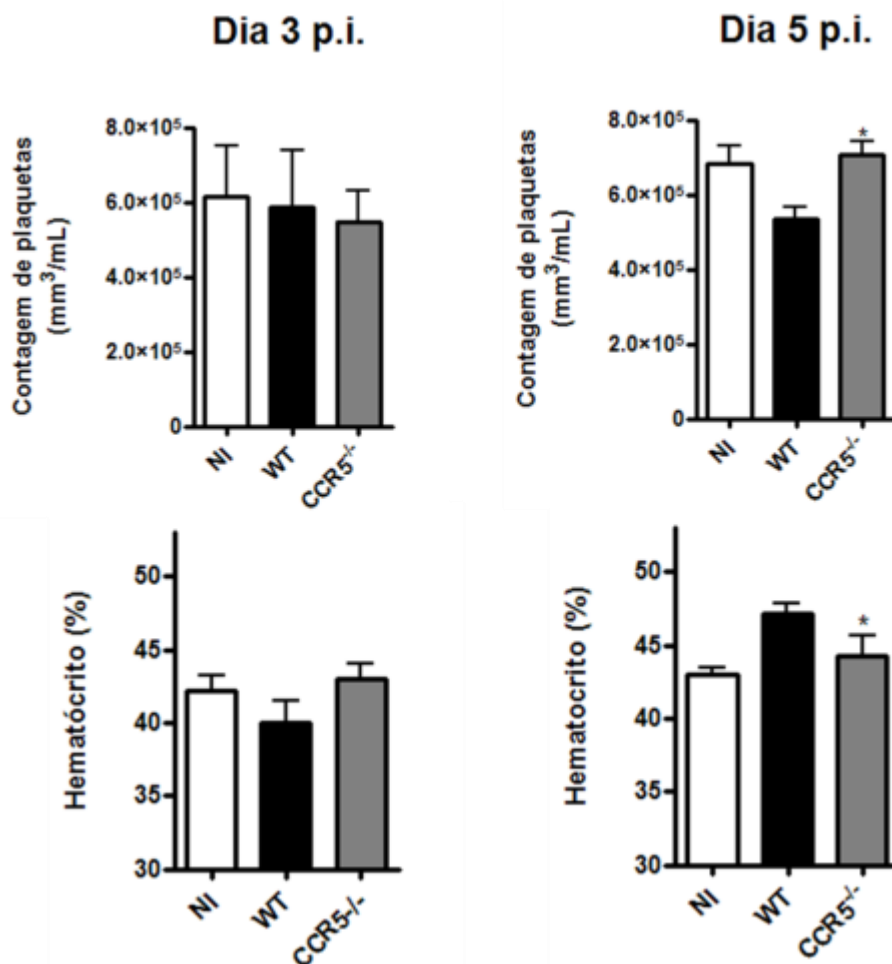


Figura 15 - Camundongos CCR5^{-/-} não apresentam alterações hematológicas nas fases iniciais de infecção por DENV-2

Camundongos WT ou CCR5^{-/-} foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ DENV-2 adaptado ao camundongo, diluídos em PBS. Animais foram sacrificados aos dias 3^o (coluna esquerda) e 5^o p.i. (coluna direita) para obtenção de amostras sanguíneas posteriormente submetidas a contagem de plaquetas e mensuração do índice de hematócrito. Os resultados são expressos como número de plaquetas por mm³/mL de sangue e porcentagem de hematócrito. A diferença estatística entre as colunas é definida por P<0.05 (*) em relação ao controle positivo (grupo WT). Para cada experimento, n = 4-7 animais por grupo. NI – camundongos WT não-infectados

O influxo de neutrófilos nos órgãos durante a infecção por DENV-2 é associado a um processo inflamatório sistêmico e ao dano tecidual nos camundongos no pico da infecção (FIG.2). A medida indireta do influxo neutrofílico nos órgãos dos camundongos WT e CCR5^{-/-}, pela medição da atividade de mieloperoxidase (MPO) é indetectável no fígado dos animais infectados ao 5^o dia p.i (FIG.16). Os valores de atividade de MPO encontrados no baço de animais WT não diferem dos valores encontrados no grupo controle NI, indicando que neste tempo p.i. avaliado não há influxo de neutrófilos significativo nos órgãos e, portanto, não há diferenças entre os grupos experimentais.

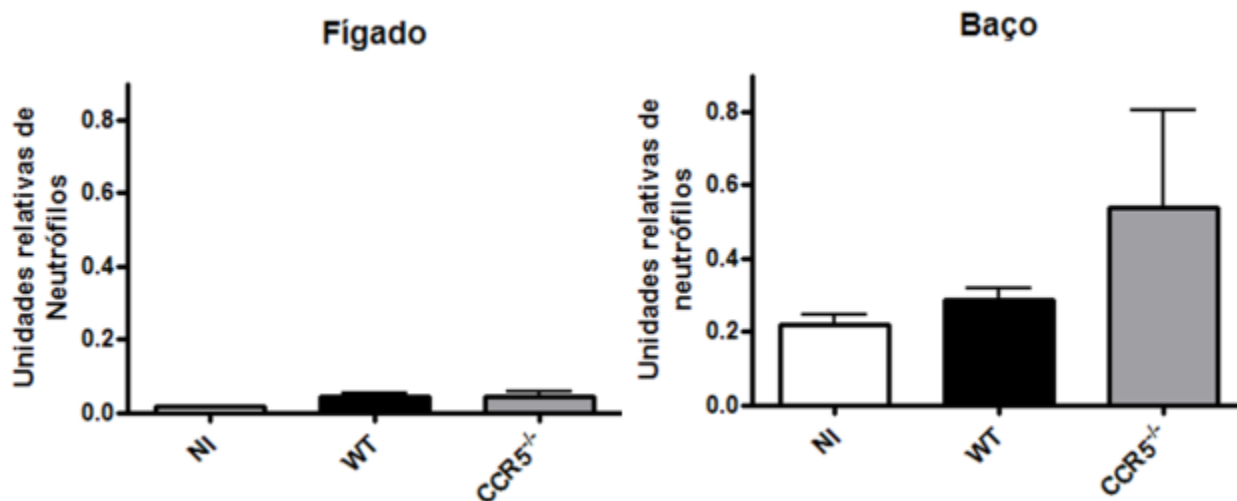


Figura 16 - Camundongos CCR5^{-/-} e WT não apresentam diferenças no acúmulo de neutrófilos nos tecidos ao 5º dia após infecção por DENV-2

Camundongos WT ou CCR5^{-/-} foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ DENV-2 adaptado ao camundongo, diluídos em PBS. Animais foram sacrificados ao dia 5 p.i. para obtenção de amostras de fígado (esquerda) e baço (direita) posteriormente processadas e submetidas à detecção da atividade da enzima MPO. Os resultados são expressos como unidades relativas de neutrófilos, após conversão dos valores de OD inicial e normalização. Para cada experimento, n = 4-7 animais por grupo. NI – WT não-infectado

Juntamente com os parâmetros acima avaliados, a produção excessiva de citocinas é um sinal clínico associado à doença e foi avaliada ao 5º dia p.i. no modelo animal. Os níveis de cinco citocinas: IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e a quimiocina CXCL1/KC foram quantificados no soro, baço e fígado de animais WT, CCR5^{-/-} e NI (FIG.17). Apesar do perfil de expressão de cada citocina variar em função do tecido avaliado, não há diferenças na produção de mediadores entre os grupos WT e CCR5^{-/-} ao 5º dia p.i.. Há um aumento na produção das citocinas IFN- γ e CXCL1/KC no baço e soro de camundongos WT e CCR5^{-/-} em relação ao controle NI, indicando que esses animais estão respondendo à infecção por DENV. No fígado, os elevados níveis basais das citocinas avaliadas não evidenciaram quaisquer diferenças entre os grupos experimentais.

A citocina IL-10, caracterizada por seu papel antiinflamatório em vários modelos de estudo de doenças, não apresentou diferenças entre os grupos [100-102]. De forma similar, a citocina IFN- γ , relacionada ao desenvolvimento de respostas antivirais [103, 104], apresentou níveis semelhantes no soro e tecidos de camundongos WT e CCR5^{-/-}.

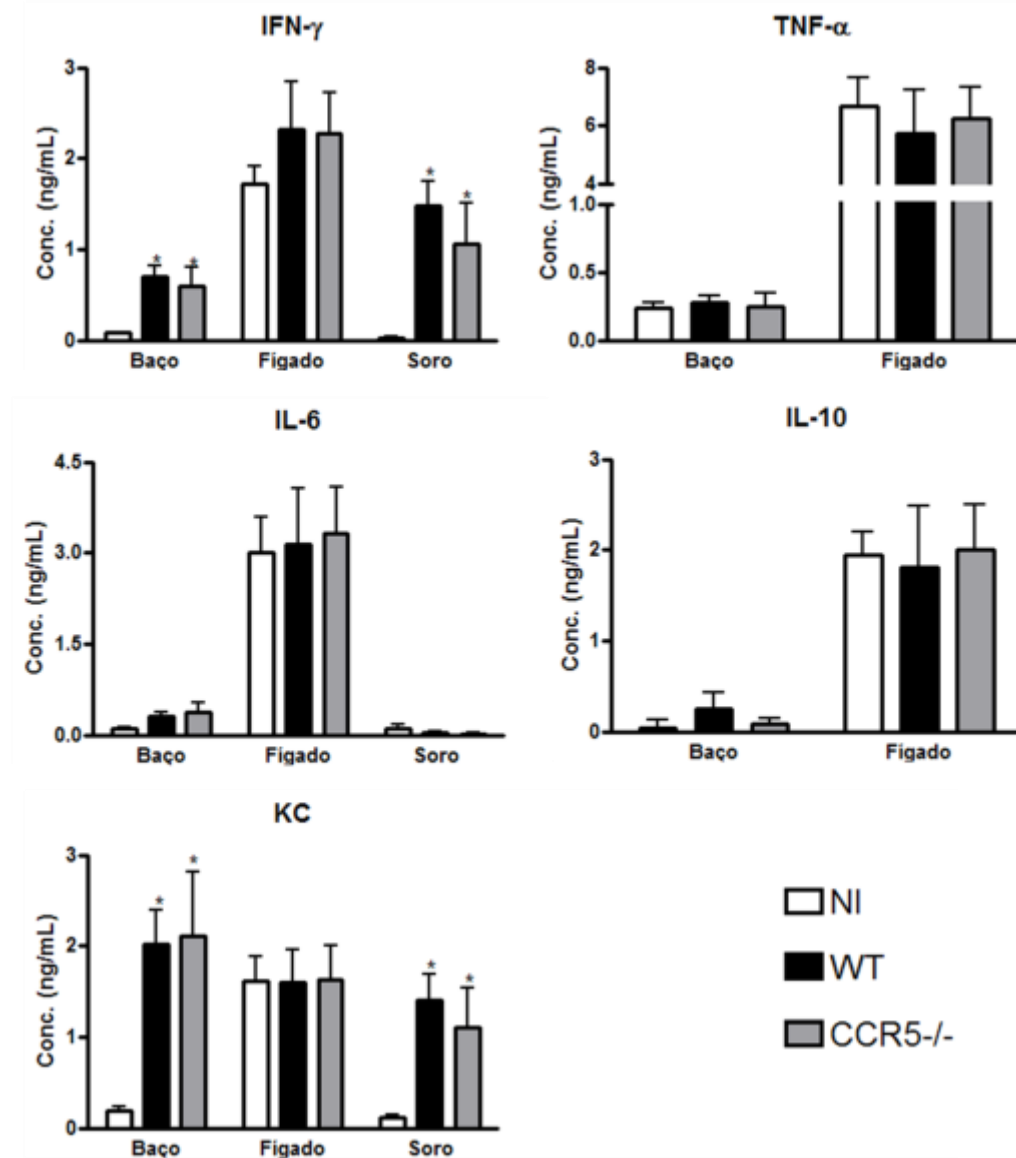


Figura 17 - Camundongos CCR5^{-/-} e WT não apresentam diferenças na produção de citocinas ao 5º dia após infecção por DENV-2

Camundongos WT ou CCR5^{-/-} foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ DENV-2 adaptado ao camundongo, diluídos em PBS. Animais foram sacrificados ao dia 5º p.i. para obtenção de amostras de sangue, baço e fígado posteriormente processadas para detecção de citocinas. Os resultados são expressos em ng/mL de soro ou tecido processado. As diferenças são representadas por P<0.05 (*) em relação ao controle negativo (grupo NI). Para cada experimento, n = 4-7 animais por grupo. NI – WT não-infectado

Sumarizando, em momentos iniciais na infecção por DENV, camundongos WT apresentam um aumento no índice de hematócrito e diminuição da contagem de plaquetas no sangue, representativos das alterações hematológicas manifestadas posteriormente na doença (FIG.15). A atividade de MPO foi similar nos órgãos de animais WT, CCR5^{-/-} e NI nos momentos iniciais da infecção (FIG.16), indicando que não houve influxo de neutrófilos nos tecidos. A produção de citocinas ao 5º dia não aponta diferenças entre os grupos WT e CCR5^{-/-}, mas juntamente com as alterações hematológicas, evidencia o estabelecimento da infecção, dado pelo aumento de

IFN- γ e CXCL1/KC nos grupos WT e CCR5^{-/-} em relação ao grupo NI (FIG.17). De forma geral, camundongos CCR5 não apresentam quaisquer parâmetros inflamatórios relacionados à doença ao 3^o e 5^o dias p.i.

Assim, camundongos WT e CCR5^{-/-} são ambos infectados pelo DENV-2 (FIG.14), mas ao invés de desenvolver a doença e sucumbir à infecção como os camundongos WT ao 7^o dia p.i., os camundongos CCR5^{-/-} previnem o desenvolvimento da doença e conseqüente morte (FIG.2). Desta forma, camundongos CCR5^{-/-} não adoecem em nenhum momento durante a infecção.

O receptor CCR5 é expresso nos tecidos de camundongos WT infectados e sua expressão varia ao longo da infecção

A dinâmica do crescimento da carga viral nos tecidos dos camundongos infectados e o aparecimento de parâmetros inflamatórios, como o aumento da atividade de MPO e dos níveis de citocinas, são observados em maior escala no baço e depois no fígado e sangue (FIG.14,17). A dinâmica de expressão do receptor CCR5 no baço e fígado durante a infecção é desconhecida, e a determinação de seu perfil de expressão facilitaria o entendimento de sua participação na infecção pelo DENV-2.

Para tal propósito, a coleta do baço e fígado de animais WT infectados e não-infectados nos dias 3, 5 e 7 p.i. e sua análise por PCR quantitativo revelou que o receptor CCR5 é expresso nos tecidos de camundongos infectados, e que essa expressão segue padrões distintos em cada órgão (FIG.18).

No baço, a expressão de CCR5 é quase triplicada nos períodos iniciais de infecção, nos dias 3 e 5 p.i., quando comparada à expressão de CCR5 no grupo NI. Em contraste, ao 7^o dia p.i., o nível de expressão de CCR5 cai e se torna similar ao grupo controle. No fígado, a expressão de CCR5 aumenta constantemente, atingindo seu pico ao 7^o dia p.i., onde os níveis são sete vezes maiores que os níveis de expressão nos tecidos de camundongos NI.

Esses dados confirmam a expressão do receptor CCR5 em órgãos infectados pelo DENV e comprometidos no desenvolvimento da doença, apesar de não discriminar se o resultado representa o aumento da expressão do receptor em células residentes ou o influxo de células CCR5⁺ no tecido. A determinação dos

tipos celulares expressando CCR5 no baço, em momentos iniciais na infecção, poderia evidenciar as células responsáveis pela formação da resposta imune ao DENV prejudicial ao hospedeiro, apresentada pelos camundongos WT no curso da infecção.

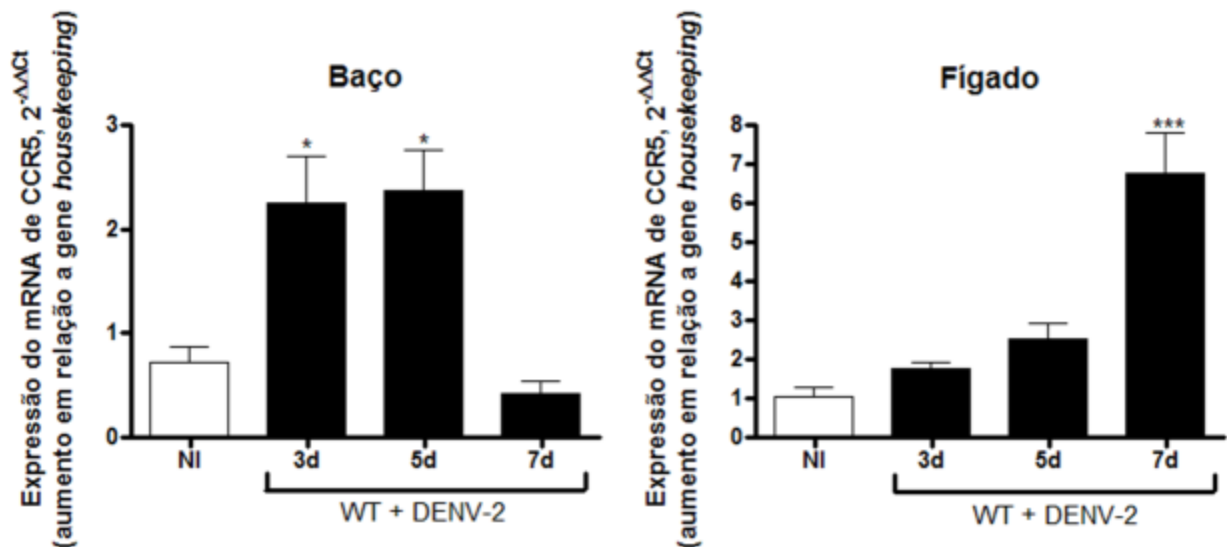


Figura 18 - O receptor CCR5 é expresso nos tecidos de camundongos WT infectados e sua expressão aumenta ao longo da infecção.

Camundongos WT foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ DENV-2 adaptado ao camundongo, diluídos em PBS. Animais foram sacrificados aos dias 3^o, 5^o e 7^o p.i. para obtenção de amostras de baço e fígado posteriormente processadas e submetidas a reação de PCR quantitativo para expressão de CCR5. Os resultados são expressos como aumento da expressão de CCR5 relativa à expressão do gene *housekeeping*. A diferença estatística entre os grupos é definida por P<0.05 (*) e P<0.001 (***). Para cada experimento, n = 4 animais por grupo. NI – não-infectado

A resposta do camundongo CCR5^{-/-} à infecção por DENV é marcada por uma elevada ativação de linfócitos no baço

A resposta imune incontrolada na dengue é crucial na patogênese da doença [35]. Como parte desse processo, a resposta imune adaptativa é descrita como possuidora de efeitos benéficos ou prejudiciais [15]. Assim, um experimento de citometria de fluxo foi realizado para determinar as populações de células do sistema imune que expressam o receptor CCR5 durante a infecção, bem como as características da resposta imune gerada por camundongos WT e CCR5^{-/-} ao DENV, capaz de levar a fenótipos tão diferentes na dengue experimental.

Grupos de camundongos WT e CCR5^{-/-} foram inoculados com DENV-2 e sacrificados ao 5^o e 7^o dias p.i. para recolhimento dos baços. Após processamento e marcação com os respectivos anticorpos, foi observada a expressão constitutiva de

CCR5 em populações F4/80⁺ e CD11c⁺, representativas de macrófagos e células dendríticas, respectivamente (FIG.19).

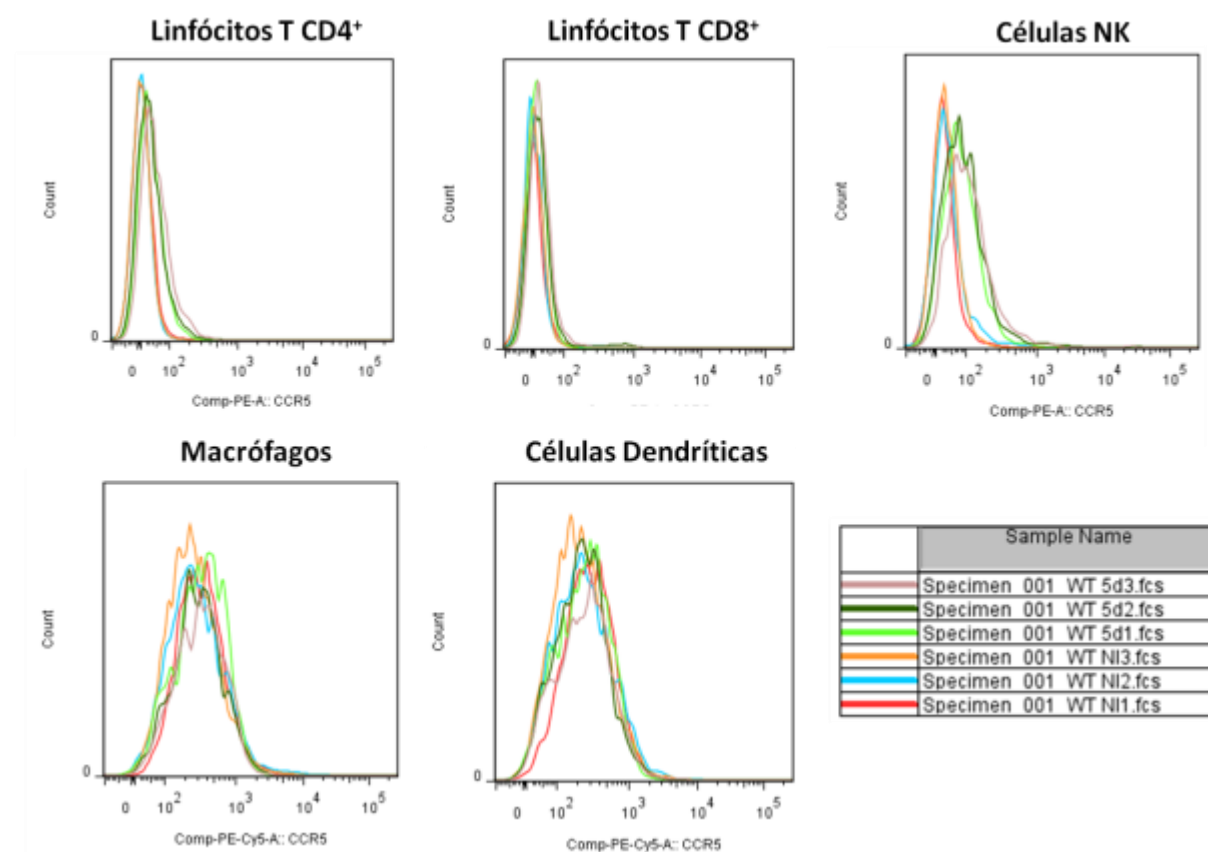


Figura 19 - A expressão de CCR5 é aumentada em linfócitos T CD4⁺ e Células NK ao 5^o dia após infecção com DENV-2

Camundongos WT foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ DENV-2 adaptado ao camundongo e sacrificados ao dia 5^o p.i. para obtenção do baço. Esplenócitos foram marcados e analisados em função da expressão de CCR5. Os *gates* foram escolhidos com base no tamanho e granulosidade das populações celulares e nos controles de isótipo. Os resultados são expressos em histogramas representativos de cada tipo celular em função da intensidade média de fluorescência da marcação anti-CCR5. Valores de MFI acima de 10² são considerados positivos. Para cada experimento, n = 3-7 animais por grupo. NI – WT não-infectado

Ao 5^o dia de infecção, a expressão de CCR5 é mantida nestas células e é aumentada em populações CD4⁺ e NK1.1⁺, especialmente nesta última população, na qual o aumento de expressão corresponde a 10 vezes os valores encontrados nos controles não-infectados (FIG.19). A marcação de esplenócitos de camundongos CCR5^{-/-} como grupo controle mostrou uma marcação inespecífica nestas células, corroborando com outros controles realizados em experimentos *in vitro* e confirmando a condição de deficiência no receptor CCR5 apresentada pelo camundongo *knockout* (dados não mostrados).

A análise das populações de linfócitos revela uma forte linfopenia no baço de camundongos WT infectados, comparados ao controle NI, que não é encontrada em

camundongos CCR5^{-/-}. De fato, o grupo CCR5^{-/-} apresenta um enorme aumento no número de células CD8⁺, de 3 milhões no grupo NI para 20 milhões no grupo CCR5^{-/-} (FIG.20 quadros superiores). Ainda, células CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos CCR5^{-/-} possuem uma expressão aumentada do marcador CD69 em comparação com

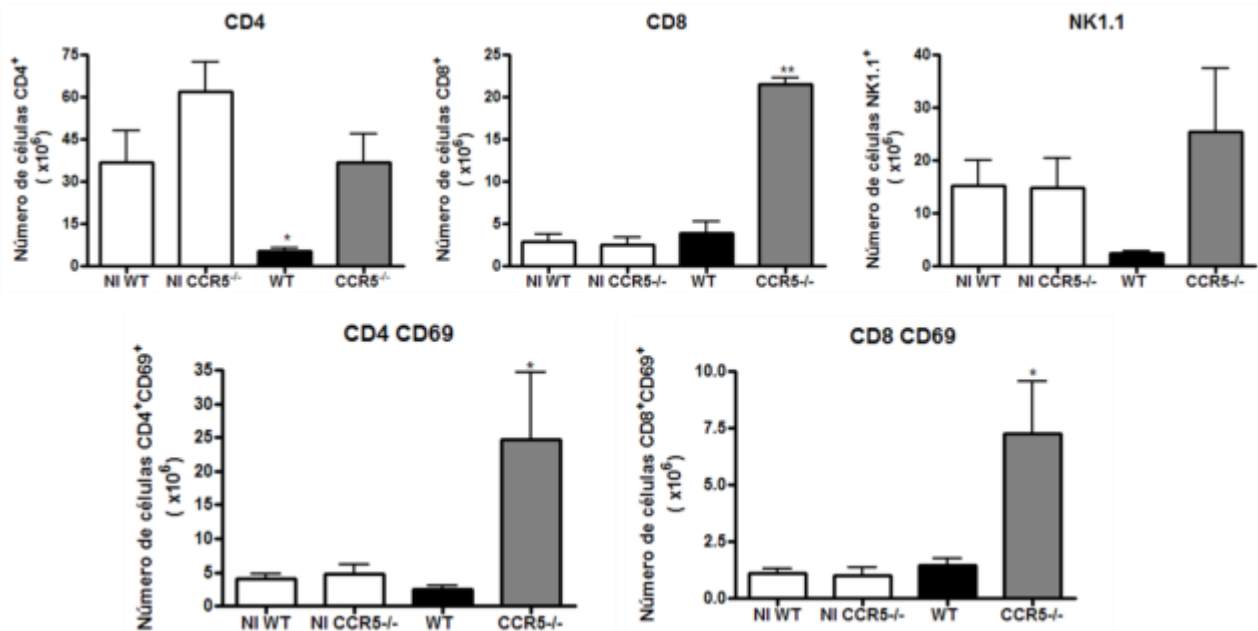


Figura 20 - Camundongos CCR5^{-/-} apresentam elevada frequência e ativação de linfócitos ao 5º dia após infecção por DENV-2

Camundongos WT foram injetados via intraperitoneal com 10 PFU/ 10LD₅₀ DENV-2 adaptado ao camundongo e sacrificados ao dia 5º p.i. para obtenção do baço. Esplenócitos foram marcados e analisados em função da frequência e ativação de populações de linfócitos. Os *gates* foram escolhidos com base nos controles de isótipo. Os resultados são expressos em número de células positivas, corrigidas pela contagem total dos esplenócitos de cada animal. Para cada experimento, n = 3-7 animais por grupo. NI – não-infectado. Diferenças entre os grupos são representadas por P<0.05 (*) e P<0.01 (**).

outros grupos, indicando que há maior ativação de linfócitos no grupo CCR5^{-/-} infectado (FIG.20 quadros inferiores). Em contrapartida às outras populações linfóides avaliadas, as células CD8⁺ não aumentam a expressão do receptor CCR5 durante a infecção (FIG.19), apesar da pronunciada expansão e ativação dessa população celular no processo. De forma interessante, camundongos não-infectados WT e CCR5^{-/-} apresentam somente uma diferença na frequência das populações analisadas, correspondendo ao fato que camundongos CCR5^{-/-} apresentam um número de células CD4⁺ no baço aproximadamente duplicado em relação ao número de células CD4⁺ normalmente encontradas no baço de camundongos WT.

A expressão diferencial de CCR5 em células CD4⁺ e NK1.1⁺ durante ao 5º p.i. confirma os resultados de expressão do receptor no baço (FIG.18) e o

engajamento do receptor CCR5 na resposta imune contra o vírus. O acúmulo e ativação de linfócitos T são menores durante a infecção em camundongos WT do que em camundongos CCR5^{-/-}. Portanto, uma potente resposta de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ao 5º dia p.i. nos camundongos CCR5^{-/-} pode ser responsável pela eliminação do vírus dos tecidos deste camundongo, observada ao 7º dia p.i.

DISCUSSÃO

A dengue é a mais importante arbovirose do mundo. A disseminação dos quatro sorotipos do DENV e a presença dos mosquitos do gênero *Aedes* através do globo coloca em risco aproximadamente 2.5 bilhões de pessoas. Apesar de sua relevância, os mecanismos patogênicos da doença, bem como os responsáveis pela proteção, são pouco entendidos e envolvem a interação entre o DENV e a resposta imune do hospedeiro. O sistema de quimiocinas e seus receptores medeiam o recrutamento e ativação de leucócitos, e é essencial na resposta frente a um grande número de patógenos. No entanto, a atividade pró-inflamatória de algumas quimiocinas e seus receptores em respostas imunes excessivas, desreguladas, freqüentemente contribui ao desenvolvimento de doenças ao invés de curá-las. Trabalhos recentes desenvolvidos no laboratório [90] e por outros grupos [7, 88, 91] apontaram o papel das quimiocinas CC e seus receptores na dengue, e neste trabalho é demonstrado que o receptor CCR5 é crucial para a replicação do vírus, desenvolvimento da doença e morte induzida pela infecção experimental por DENV.

A resistência completa de camundongos CCR5^{-/-} à infecção letal com diferentes inóculos de DENV-2, apresentada na introdução (FIG.1), foi averiguada e estudada a fim de visualizar algumas das características da proteção à mortalidade. A repetição do ensaio de letalidade em camundongos WT e CCR5^{-/-} com a linhagem de DENV-2, acompanhada em paralelo pela infecção com a linhagem de DENV-3 adaptada ao camundongo, confirmou a resistência dos camundongos deficientes no receptor e fortaleceu o fenótipo de proteção (FIG.5). Por se tratar de outro sorotipo de DENV, adaptado ao hospedeiro murino de forma independente ao DENV-2 utilizado, a infecção com DENV-3 indica que o fenótipo de proteção apresentado pelo grupo CCR5^{-/-} não é restrito a um único sorotipo viral, e pode se estender a sorotipos ainda não estudados (DENV-1, DENV-4). A deficiência no receptor CCR5 é tida como prejudicial em outras infecções por flavivirus [81], mas têm se provado benéfica no contexto de infecção por DENV-2. Algum fenótipo era esperado no camundongo CCR5^{-/-} após a infecção por DENV, porém a intensidade e particularidade de proteção na dengue experimental são marcantes e contrastam com exemplos de outros membros do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae*.

A resistência à dengue experimental apresentada pelos animais CCR5^{-/-} não envolve um atraso na manifestação da mortalidade após infecção, considerando que estes animais não morrem mesmo quando observados por quatro semanas após a inoculação do vírus (FIG.6A). Quando desafiados com um inóculo excessivo de DENV-2 (1000 PFU/ 1000 LD₅₀) (FIG.6B), os animais CCR5^{-/-} começam a apresentar mortalidade decorrente da infecção, mostrando que o mecanismo de proteção não era “perfeito”, podendo ser contornado pelo DENV se administrado um inóculo viral suficientemente grande.

As observações feitas no grupo CCR5^{-/-} podem ser reproduzidas em camundongos WT pelo pré-tratamento com antagonistas do receptor CCR5 (FIG.3,7). O pré-tratamento age como um “nocaute farmacológico”, bloqueando o receptor antes da infecção, de forma similar ao grupo de camundongos deficientes no receptor de quimiocinas. A utilização do antagonista do receptor CCR5, o composto UK-484900, em ensaios de letalidade em camundongos WT, confirmou a eficácia do bloqueio do receptor CCR5 em prevenir a mortalidade decorrente da infecção por DENV. De forma similar ao composto Met-RANTES, somente o pré-tratamento com UK-484900 é eficaz em proteger os animais infectados, em detrimento à utilização do pós-tratamento com o antagonista (FIG.7). O composto UK-484900 é uma pequena molécula, de propriedades e interação com o receptor CCR5 diferentes do antagonista Met-RANTES, que indica que diversas formas de bloqueio do receptor podem ser eficazes na prevenção da dengue grave. Portanto, o sucesso de utilização dos dois fármacos indica que o bloqueio do receptor CCR5 pode vir a se tornar um tratamento contra a dengue, mas somente poderia ser empregado como profilaxia, se avaliado para testes clínicos.

Dada a sua importância no ciclo de vida do HIV e a literatura extensa caracterizando o receptor CCR5 como co-receptor para entrada viral [72-74, 76], foi testada a hipótese de que deficiência no receptor CCR5 prejudicaria a entrada do DENV nas células. Os resultados mostraram que o receptor CCR5 era dispensável no processo de entrada viral, fato que foi demonstrado em diferentes sistemas celulares e usando diferentes linhagens virais: um Isolado clínico humano de DENV-2 (FIG.8) e a linhagem adaptada ao camundongo (FIG.10), apoiando esta conclusão. Corroborando com esses dados, a curva de replicação viral em macrófagos, realizada posteriormente aos experimentos de entrada viral, também

indica que não há impedimento da entrada do DENV nas células CCR5^{-/-} (FIG.11), sendo que não há diferenças entre as cargas virais de amostras WT e CCR5^{-/-} ao tempo de 24 horas p.i..

O experimento de entrada viral usando o pré-tratamento com o antagonista Met-RANTES e a toxina PTX (FIG.10), bem como os outros experimentos *in vitro*, confirmaram que o ensaio de infecção em macrófagos é reprodutível. Para um mesmo tipo de amostras e uma mesma MOI, a carga viral nos grupos WT infectados de cada experimento (grupo controle positivo para infecção) sempre se iniciam com os mesmos títulos virais. Outro fato significativo, observado neste experimento, é que a carga viral não aumenta nas primeiras 24 horas de infecção. Esse período pode representar as horas necessárias para iniciar a tradução das proteínas e replicação do genoma viral, prévios à liberação das primeiras partículas virais [25].

A participação do receptor CCR5 em outros estágios do ciclo de vida viral, a exemplo do seu papel na infecção pelo *Vaccinia virus* [86], se mostrou verdadeira no contexto de infecção pelo DENV. Os experimentos com culturas primárias de macrófagos peritoneais demonstraram que o DENV replica lentamente em macrófagos deficientes em CCR5 quando comparados a macrófagos WT, correspondendo a um atraso na replicação viral nestas células (FIG.11,12). De início, o atraso de aproximadamente 48 horas na replicação do DENV em macrófagos CCR5^{-/-} *in vitro* pareceu insuficiente para explicar a tamanha proteção observada nos camundongos CCR5^{-/-}. No entanto, foi considerado que a carga viral nos tecidos dos animais CCR5^{-/-} poderia ser lidada com mais facilidade pelo sistema imune, não somente em função de seu tamanho reduzido, mas do tempo extra que requer para proliferar em altas quantidades. A titulação viral de tecidos dos camundongos WT e CCR5^{-/-} em momentos iniciais na infecção confirmou que os camundongos CCR5^{-/-} de fato possuem menos vírus em seus tecidos no início da infecção (FIG.14) e que conseguem eliminá-los dos mesmos ao longo dos dias p.i. (FIG.2D).

O atraso observado na replicação viral em macrófagos CCR5^{-/-} pôde ser reproduzido em macrófagos WT utilizando uma abordagem farmacológica, novamente confirmando a eficácia dos antagonistas do receptor CCR5 (FIG.13). Os

resultados do pré-tratamento com Met-RANTES ou PTX confirmam que o receptor CCR5 é requerido ao processo de replicação do DENV em macrófagos, provavelmente através de eventos relacionados à sua sinalização intracelular. A realização de outro experimento similar com amostras de lisado celular, não tituladas neste experimento, confirmaria a reprodutibilidade dos resultados obtidos com as amostras de sobrenadante de cultura (FIG.13). O tratamento de macrófagos com Met-RANTES e PTX após a infecção confirmaria se somente o regime de pré-tratamento com essas drogas é eficaz em reduzir a replicação viral *in vitro*, de forma paralela aos pré- e pós- tratamentos realizados com antagonistas de CCR5 no modelo animal (FIG.3,7).

Experimentos de pós-tratamento em macrófagos com os ligantes do receptor CCR5: CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES, evidenciarão como a ativação do receptor pode modular a replicação viral. Se a ativação do receptor pelos ligantes ativar vias de sinalização benéficas ao DENV, a progênie viral aumentaria. Caso contrário, se os ligantes competirem com o vírus pelo receptor CCR5 e suas vias, haveria prejuízo no processo de replicação. O mecanismo pelo qual o receptor CCR5 confere essa permissividade a macrófagos na infecção por DENV e como a deficiência no receptor prejudica a replicação do vírus ainda serão estudados. Possíveis alvos são as vias envolvendo as proteínas JNK e PI3K, já associadas à replicação do DENV [105, 106] e passíveis de ativação via CCR5. Dado o potente efeito da toxina PTX sobre a replicação do DENV em macrófagos, outros GPCRs e vias envolvendo proteínas G monoméricas também deverão ser estudadas.

Como mencionado anteriormente, a replicação atrasada do DENV-2 em células CCR5^{-/-} *in vitro* foi observada *in vivo*, no modelo animal, pela titulação viral de tecidos de camundongos WT e CCR5^{-/-} infectados aos 3^o e 5^o dias p.i. A infecção por DENV-2 se estabelece em ambos os grupos de animais, no entanto, os títulos virais são reduzidos nos tecidos dos camundongos CCR5^{-/-} quando comparados a títulos virais nos tecidos WT (FIG.14). O DENV é capaz de infectar vários tipos celulares, e é possível que a diferença entre as cargas virais encontradas nos tecidos de camundongos WT e CCR5^{-/-} não seja uma consequência unicamente relacionada ao atraso de replicação em macrófagos CCR5^{-/-}. Outras células expressando o receptor CCR5 estão presentes no baço e no fígado, dentre elas as

células dendríticas e células de *Kupffer*, sendo provável que também contribuam ao atraso na replicação viral em um contexto de deficiência no receptor CCR5.

De forma interessante, camundongos WT apresentam uma doença discreta ao 5º dia p.i., nunca apresentada por camundongos CCR5^{-/-} durante as fases iniciais (3º e 5º dias) (FIG.15,16,17) ou ao pico da infecção (FIG.2). Camundongos WT apresentam hemoconcentração, plaquetopenia e elevações nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e CXCL1/KC ao 5º dia p.i., que correspondem ao aparecimento de doença nestes animais e à sua contínua piora observada nos dias seguintes. Camundongos CCR5^{-/-}, apesar de infectados, produzem citocinas mas não apresentam alterações hematológicas ou acúmulo de neutrófilos nos tecidos a qualquer tempo p.i. avaliado. Essa inflamação reduzida no camundongo CCR5^{-/-} após a infecção não pode ser explicada pela produção de IL-10 (FIG.14), citocina de conhecido papel antiinflamatório [100-102], sendo que seus níveis são similares nos órgãos de camundongos WT e CCR5^{-/-}.

As quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES, não foram dosadas ao 5º dia. Os níveis dessas quimiocinas ao 7º dia p.i. somente exemplificam a inflamação excessiva de animais WT em contraste a animais CCR5^{-/-}, sendo produzidas em altos níveis nos órgãos de camundongos WT infectados e inalteradas nos órgãos de camundongos CCR5^{-/-} (dados não mostrados). Como o fenótipo do camundongo deficiente no receptor CCR5 se mostrava mais relacionado a um papel direto do receptor, e não a efeitos secundários de seus ligantes, outros experimentos foram priorizados.

É importante notar que o atraso na replicação do DENV em tecidos de animais CCR5^{-/-} nas fases iniciais da infecção é o principal fator por trás do fenótipo de proteção, mas não é o único. A presença de carga viral nos órgãos de animais CCR5^{-/-} ao 5º dia p.i. e de seus resquícios ao 7º dia p.i., mas não da doença, mostram que esses animais controlam a resposta inflamatória ao vírus. Em conjunto, a dificuldade de replicação do DENV em células CCR5^{-/-} levaria a uma carga viral reduzida, tolerável, nos tecidos nas fases iniciais da infecção. A subsequente resposta imune ao DENV poderia eliminar o vírus dos órgãos de forma eficiente, prevenindo o dano tecidual e conseqüente choque, levando à sobrevivência do camundongo CCR5^{-/-}.

De forma contrária, a proliferação viral contínua nas células e tecidos de camundongos WT leva ao acúmulo crescente de partículas virais nos locais infectados, observados *in vitro* e *in vivo*. A carga viral originada e em expansão é um estímulo crescente ao sistema imune, que em contrapartida promove a resposta inflamatória excessiva que leva ao dano tecidual, choque hipovolêmico e morte, ao invés de eliminar o DENV do hospedeiro. Portanto, a sobrevivência do camundongo CCR5^{-/-} após a infecção por DENV-2 depende do balanço entre a (efetiva) eliminação do vírus e a (reduzida) inflamação, ambos derivados da reduzida carga viral nas fases iniciais da infecção. Assim, determinar como a resposta imune ao DENV no camundongo CCR5^{-/-} é estimulada, quais os tipos celulares prevalentes e como essa resposta é capaz de eliminar o DENV de forma tão eficiente são pontos importantes na evolução desta pesquisa. De forma similar à proposta *in vitro*, o tratamento de camundongos WT com as quimiocinas ativadoras do receptor CCR5 após a infecção evidenciaria as conseqüências de sua ativação no curso da doença, para a replicação do DENV e para a resposta do hospedeiro à infecção.

O experimento de PCR quantitativo para a expressão do receptor CCR5 no baço e fígado de camundongos WT infectados mostrou que o perfil e o pico da expressão do receptor CCR5 diferem entre os órgãos e sugere o envolvimento do receptor CCR5 em períodos iniciais de infecção, no baço, e em períodos posteriores no fígado (FIG.18). Esse perfil corrobora com a detecção do vírus e de sinais de doença em maior escala no baço e posteriormente no fígado, onde a carga viral pode atingir 10¹⁰ PFU/ 100mg de tecido (FIG.2).

A análise da expressão de CCR5 em populações de leucócitos no baço de camundongos WT mostrou que linfócitos T CD4⁺ e células NK aumentam a expressão do receptor durante a infecção por DENV e confirmam o engajamento do receptor CCR5 na resposta imune à infecção (FIG.19). O aumento da expressão de CCR5 nas populações CD4⁺ e NK 1.1⁺ ao 5º dia p.i. é concomitante ao aumento da expressão de CCR5 no baço neste período p.i. (FIG.18), possivelmente correspondendo aos tipos celulares envolvidos no aumento de expressão de CCR5 no órgão. O perfil ativado das populações de linfócitos T em camundongos CCR5^{-/-} demonstra o papel crucial do receptor CCR5 na modulação de respostas imunes adaptativas ao DENV (FIG.20). A resposta de linfócitos T CD8⁺ é bem caracterizada como crítica para a eliminação de patógenos intracelulares em vários modelos de

infecção [85, 107, 108], e a expansão e ativação marcantes dessa população é concomitante à eliminação do DENV-2 dos tecidos CCR5^{-/-}. A proteção e o controle da replicação viral por linfócitos T CD8⁺ na dengue é descrita em outros modelos experimentais e corrobora com os dados encontrados [109]. O papel desempenhado pelos linfócitos T CD4⁺ e células NK neste contexto ainda são desconhecidos, apesar de provavelmente participarem e apoiarem a resposta T CD8⁺ em um perfil Th1 de diferenciação [110, 111].

Em contrapartida, a citocina IFN- γ , associada a respostas imunes antivirais [103], de perfil Th1, é produzida em níveis similares pelos grupos WT e CCR5^{-/-}, ao 5^o dia p.i. A mesma produção de IFN- γ no baço e soro dos camundongos não corrobora com a diferente carga viral encontrada nos tecidos dos grupos WT e CCR5^{-/-}, apesar de um trabalho recente do nosso grupo apontar o IFN- γ como componente importante da resposta de camundongos à infecção por DENV-2 [104]. A produção de IFN- γ , neste caso, parece estar mais bem associada à resposta inflamatória na infecção, notada pelos níveis elevados da citocina no baço ao pico da infecção em camundongos WT, mas não em camundongos CCR5^{-/-} (FIG.2,3). Esta discrepância também sugere que os mecanismos pelos quais o receptor CCR5 influencia a resposta imune são independentes, pelo menos em parte, da produção e atividade de IFN- γ .

Novos estudos determinarão as populações *T helper* derivadas no compartimento de linfócitos T CD4⁺ e sua contribuição à patogênese ou proteção à doença. Tanto quanto, as células NK são um interessante objeto de estudo, em função do marcante aumento na expressão de CCR5 durante a infecção e por sua participação em respostas agudas a infecções virais [112, 113]. De forma interessante, células NK são encontradas em alta frequência no fígado e o aumento de expressão de CCR5 decorrente à infecção por DENV nesta célula pode estar relacionado ao aumento da expressão de CCR5 no fígado ao 5^o dia p.i. (FIG.18). Ainda, trabalhos recentes do nosso grupo sugerem que a ativação excessiva das células NK contribuiria para o dano hepático durante a infecção por DENV [94], representando mais uma evidência da participação dessas células na doença.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos traçados, os principais achados experimentais descritos nesta dissertação foram:

- Camundongos CCR5^{-/-} são resistentes à infecção por linhagens de DENV-2 e DENV-3 adaptadas ao camundongo. A alta sobrevivência apresentada pelo grupo CCR5^{-/-} não é consequência de um atraso na mortalidade após infecção pelo DENV.

- O bloqueio farmacológico do receptor CCR5 é eficaz em proteger animais WT da mortalidade e doença decorrentes da infecção, quando utilizado de forma profilática.

- O receptor CCR5 não está envolvido no processo de entrada do DENV-2 nos tipos celulares estudados. No entanto, o receptor CCR5 é requerido ao processo de replicação viral em macrófagos e sua deficiência atrasa a replicação do DENV-2 nesta célula.

- O atraso na replicação do DENV-2 em macrófagos CCR5^{-/-} é observado nos tecidos de animais CCR5^{-/-}, prejudicando a proliferação e disseminação do DENV-2 nos órgãos de camundongos CCR5^{-/-} infectados.

- Camundongos CCR5^{-/-} não apresentam quaisquer sinais de doença em *time-points* prévios ao pico da infecção por DENV-2. Em conjunto com os dados do 7º dia p.i., a análise dos parâmetros inflamatórios indica que camundongos CCR5^{-/-} nunca adoecem em decorrência da infecção.

- A expressão do receptor CCR5 é aumentada em células do sistema imune ao longo da infecção por DENV-2. Camundongos CCR5^{-/-} não apresentam a linfopenia no baço apresentada pelos camundongos WT ao 5º dia p.i. e possuem um acúmulo de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados que podem estar relacionados com a eliminação do DENV-2 dos tecidos de camundongos CCR5^{-/-} ao longo da infecção.

Em conclusão, os resultados demonstraram que o receptor CCR5 possui um papel crítico no desenvolvimento da doença e morte no modelo experimental de infecção por DENV em camundongos. O receptor CCR5 é uma molécula do hospedeiro requerida pelo DENV na replicação em sua célula-alvo, o macrófago, e a

ausência do receptor CCR5 atrasa a replicação do vírus nesta célula. O impacto da deficiência do receptor CCR5 em macrófagos é observado no hospedeiro, o camundongo CCR5^{-/-}, que apresenta carga viral muito reduzida ou indetectável após infecção com DENV-2. Ao prejudicar a replicação viral, a deficiência no receptor CCR5 previne a doença e morte dos animais, levando à geração de uma resposta imune que elimina o vírus de forma efetiva sem danos colaterais aos tecidos do camundongo.

Assim, testar o receptor CCR5 no contexto da dengue em humanos é essencial e plausível, especialmente devido à existência de indivíduos homozigotos para o alelo *ccr5Δ32*, que não possuem um receptor CCR5 funcional. Vários antagonistas do receptor CCR5 estão disponíveis, incluindo o composto Maraviroc que é disponível comercialmente, podendo ser aplicados em áreas endêmicas de dengue durante as epidemias sazonais da doença. Por fim, um melhor entendimento do mecanismo molecular pelo qual a ausência do receptor CCR5 afeta a replicação do DENV e como o receptor modula a resposta imune ao vírus evidenciarão mecanismos patogênicos cuja compreensão é necessária ao desenvolvimento de tratamentos e vacinas para a dengue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guzman, M.G. and G. Kouri, *Dengue: an update*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(1): p. 33-42.
2. Mackenzie, J.S., D.J. Gubler, and L.R. Petersen, *Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses*. Nat Med, 2004. **10**(12 Suppl): p. S98-109.
3. Kalayanarooj, S., et al., *Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness*. J Infect Dis, 1997. **176**(2): p. 313-21.
4. Kyle, J.L. and E. Harris, *Global spread and persistence of dengue*. Annu Rev Microbiol, 2008. **62**: p. 71-92.
5. WHO, *Dengue and Dengue haemorrhagic fever. Factsheet N 117*. 2008.
6. Gibbons, R.V. and D.W. Vaughn, *Dengue: an escalating problem*. BMJ, 2002. **324**(7353): p. 1563-6.
7. Bozza, F.A., et al., *Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity*. BMC Infect Dis, 2008. **8**: p. 86.
8. Lee, Y.R., et al., *MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 12): p. 3623-30.
9. Medin, C.L., K.A. Fitzgerald, and A.L. Rothman, *Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 11053-61.
10. Green, S., et al., *Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity*. J Med Virol, 1999. **59**(3): p. 329-34.
11. Green, S., et al., *Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever*. J Infect Dis, 1999. **180**(5): p. 1429-35.
12. Deen, J.L., et al., *The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment*. Lancet, 2006. **368**(9530): p. 170-3.
13. Whitehead, S.S., et al., *Prospects for a dengue virus vaccine*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(7): p. 518-28.
14. Pierson, T.C., et al., *Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(3): p. 229-38.
15. Rothman, A.L., *Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 532-43.
16. Wang, E., et al., *Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3227-34.
17. Avirutnan, P., et al., *Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 424-33.
18. Heaton, N.S. and G. Randall, *Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism*. Cell Host Microbe, 2010. **8**(5): p. 422-32.
19. Kelley, J.F., et al., *Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines*. Virology, 2011. **418**(1): p. 27-39.
20. Chambers, T.J., et al., *Flavivirus genome organization, expression, and replication*. Annu Rev Microbiol, 1990. **44**: p. 649-88.
21. Holmes, E.C. and S.S. Twiddy, *The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus*. Infect Genet Evol, 2003. **3**(1): p. 19-28.
22. Zanotto, P.M., et al., *A reevaluation of the higher taxonomy of viruses based on RNA polymerases*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6083-96.
23. Modis, Y., et al., *Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 313-9.

24. Rothman, A.L., *Dengue: defining protective versus pathologic immunity*. J Clin Invest, 2004. **113**(7): p. 946-51.
25. Fernandez-Garcia, M.D., et al., *Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(4): p. 318-28.
26. Fischl, W. and R. Bartenschlager, *Exploitation of cellular pathways by Dengue virus*. Curr Opin Microbiol, 2011. **14**(4): p. 470-5.
27. Rodenhuis-Zybert, I.A., et al., *Immature dengue virus: a veiled pathogen?* PLoS Pathog, 2010. **6**(1): p. e1000718.
28. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle de Dengue - Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, B., *Balanço Dengue: Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011*. 2011: p. 12.
29. Figueiredo, R.M., et al., *Co-infection of Dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2011. **53**(6): p. 321-3.
30. Halstead, S.B., *Dengue*. The Lancet, 2007. **370**(9599): p. 1644-1652.
31. Gubler, D.J., *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(3): p. 480-96.
32. Rothman, A.L. and F.A. Ennis, *Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever*. Virology, 1999. **257**(1): p. 1-6.
33. Green, S., et al., *Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity*. J Infect Dis, 1999. **179**(4): p. 755-62.
34. Navarro-Sanchez, E., P. Despres, and L. Cedillo-Barron, *Innate immune responses to dengue virus*. Arch Med Res, 2005. **36**(5): p. 425-35.
35. Kurane, I., *Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2007. **30**(5-6): p. 329-40.
36. Balmaseda, A., et al., *Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue*. Am J Trop Med Hyg, 2006. **74**(3): p. 449-56.
37. Guzman, M.G., et al., *Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections*. Int J Infect Dis, 2002. **6**(2): p. 118-24.
38. Halstead, S.B., et al., *Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **65**(3): p. 180-3.
39. Thein, S., et al., *Risk factors in dengue shock syndrome*. Am J Trop Med Hyg, 1997. **56**(5): p. 566-72.
40. Dejnirattisai, W., et al., *Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans*. Science, 2010. **328**(5979): p. 745-8.
41. Balsitis, S.J., et al., *Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification*. PLoS Pathog, 2010. **6**(2): p. e1000790.
42. Halstead, S.B., S. Rojanasuphot, and N. Sangkawibha, *Original antigenic sin in dengue*. Am J Trop Med Hyg, 1983. **32**(1): p. 154-6.
43. Rodriguez-Madon, J.R., et al., *Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells*. J Virol, 2010. **84**(9): p. 4845-50.
44. Wu, S.J., et al., *Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 816-20.
45. Chen, Y.C. and S.Y. Wang, *Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide*. J Virol, 2002. **76**(19): p. 9877-87.
46. Kyle, J.L., P.R. Beatty, and E. Harris, *Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection*. J Infect Dis, 2007. **195**(12): p. 1808-17.
47. Tassaneetriph, B., et al., *DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells*. J Exp Med, 2003. **197**(7): p. 823-9.

48. Chen, S.T., et al., *CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 672-6.
49. Miller, J.L., et al., *The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages*. PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e17.
50. Clyde, K., J.L. Kyle, and E. Harris, *Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis*. J Virol, 2006. **80**(23): p. 11418-31.
51. Jessie, K., et al., *Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization*. J Infect Dis, 2004. **189**(8): p. 1411-8.
52. Couvelard, A., et al., *Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis*. Hum Pathol, 1999. **30**(9): p. 1106-10.
53. Chaturvedi, U.C., et al., *Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000. **28**(3): p. 183-8.
54. Martina, B.E., P. Koraka, and A.D. Osterhaus, *Dengue virus pathogenesis: an integrated view*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(4): p. 564-81.
55. Oppermann, M., *Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation*. Cell Signal, 2004. **16**(11): p. 1201-10.
56. Mueller, A. and P.G. Strange, *The chemokine receptor, CCR5*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(1): p. 35-8.
57. Rodriguez-Frade, J.M., M. Mellado, and A.C. Martinez, *Chemokine receptor dimerization: two are better than one*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 612-7.
58. Lederman, M.M., et al., *Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment*. JAMA, 2006. **296**(7): p. 815-26.
59. Bajetto, A., et al., *Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications*. J Neurochem, 2002. **82**(6): p. 1311-29.
60. Loetscher, P., et al., *CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 344-5.
61. Balasubramanian, A., R.K. Ganju, and J.E. Groopman, *Hepatitis C virus and HIV envelope proteins collaboratively mediate interleukin-8 secretion through activation of p38 MAP kinase and SHP2 in hepatocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35755-66.
62. Barcelos, L.S., et al., *Role of the chemokines CCL3/MIP-1 alpha and CCL5/RANTES in sponge-induced inflammatory angiogenesis in mice*. Microvasc Res, 2009. **78**(2): p. 148-54.
63. Aliberti, J., et al., *CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(1): p. 83-7.
64. Weiss, I.D., et al., *Ccr5 deficiency regulates the proliferation and trafficking of natural killer cells under physiological conditions*. Cytokine, 2011. **54**(3): p. 249-57.
65. Ajuebor, M.N., et al., *CCR5 deficiency drives enhanced natural killer cell trafficking to and activation within the liver in murine T cell-mediated hepatitis*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1975-88.
66. Quinones, M.P., et al., *CC chemokine receptor 5 influences late-stage atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2007. **195**(1): p. e92-103.
67. Rossol, M., et al., *Negative association of the chemokine receptor CCR5 d32 polymorphism with systemic inflammatory response, extra-articular symptoms and joint erosion in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(3): p. R91.
68. Dehmel, S., et al., *Chemokine receptor Ccr5 deficiency induces alternative macrophage activation and improves long-term renal allograft outcome*. Eur J Immunol, 2010. **40**(1): p. 267-78.
69. Combadiere, C., et al., *Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(1): p. 147-52.
70. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.

71. Floto, R.A., et al., *Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5*. Science, 2006. **314**(5798): p. 454-8.
72. Alkhatib, G., et al., *CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1*. Science, 1996. **272**(5270): p. 1955-8.
73. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. Cell, 1996. **86**(3): p. 367-77.
74. Telenti, A., *Safety concerns about CCR5 as an antiviral target*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(2): p. 131-5.
75. Olbrich, H., A.E. Proudfoot, and M. Oppermann, *Chemokine-induced phosphorylation of CC chemokine receptor 5 (CCR5)*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(3): p. 281-5.
76. Fatkenheuer, G., et al., *Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1170-2.
77. Khan, I.A., et al., *CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following Toxoplasma gondii infection*. PLoS Pathog, 2006. **2**(6): p. e49.
78. Machado, F.S., et al., *CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with Trypanosoma cruzi*. J Infect Dis, 2005. **191**(4): p. 627-36.
79. Algood, H.M. and J.L. Flynn, *CCR5-deficient mice control Mycobacterium tuberculosis infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3287-96.
80. Kroetz, D.N. and G.S. Deepe, Jr., *An aberrant thymus in CCR5-/- mice is coupled with an enhanced adaptive immune response in fungal infection*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5949-55.
81. Klein, R.S., *A moving target: the multiple roles of CCR5 in infectious diseases*. J Infect Dis, 2008. **197**(2): p. 183-6.
82. Kindberg, E., et al., *A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis*. J Infect Dis, 2008. **197**(2): p. 266-9.
83. Glass, W.G., et al., *CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection*. J Exp Med, 2006. **203**(1): p. 35-40.
84. Glass, W.G., et al., *Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1087-98.
85. Lichterfeld, M., et al., *Reduced CC chemokine receptor (CCR) 1 and CCR5 surface expression on peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis C infection*. J Infect Dis, 2002. **185**(12): p. 1803-7.
86. Rahbar, R., et al., *Vaccinia virus activation of CCR5 invokes tyrosine phosphorylation signaling events that support virus replication*. J Virol, 2006. **80**(14): p. 7245-59.
87. Rahbar, R., T.T. Murooka, and E.N. Fish, *Role for CCR5 in dissemination of vaccinia virus in vivo*. J Virol, 2009. **83**(5): p. 2226-36.
88. Sierra, B., et al., *MCP-1 and MIP-1alpha expression in a model resembling early immune response to dengue*. Cytokine, 2010. **52**(3): p. 175-83.
89. Chen, J., M.M. Ng, and J.J. Chu, *Molecular profiling of T-helper immune genes during dengue virus infection*. Virol J, 2008. **5**: p. 165.
90. Guabiraba, R., et al., *Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15680.
91. St John, A.L., et al., *Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9190-5.
92. Assuncao-Miranda, I., et al., *Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection*. FASEB J, 2010. **24**(1): p. 218-28.
93. Souza, D.G., et al., *Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 14138-43.

94. Renneson, J., et al., *A detrimental role for invariant natural killer T cells in the pathogenesis of experimental dengue virus infection*. Am J Pathol, 2011. **179**(4): p. 1872-83.
95. Proudfoot, A.E., et al., *Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist*. J Biol Chem, 1996. **271**(5): p. 2599-603.
96. Atrasheuskaya, A., et al., *Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **35**(1): p. 33-42.
97. Rodriguez-Madoz, J.R., et al., *Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9760-74.
98. Zaitseva, M., et al., *Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection*. Nat Med, 1997. **3**(12): p. 1369-75.
99. Vodros, D., et al., *Quantitative evaluation of HIV-1 coreceptor use in the GHOST3 cell assay*. Virology, 2001. **291**(1): p. 1-11.
100. Biswas, S.M., et al., *Immunomodulatory cytokines determine the outcome of Japanese encephalitis virus infection in mice*. J Med Virol, 2010. **82**(2): p. 304-10.
101. Ramakrishna, C., et al., *Passively administered pooled human immunoglobulins exert IL-10 dependent anti-inflammatory effects that protect against fatal HSV encephalitis*. PLoS Pathog, 2011. **7**(6): p. e1002071.
102. Weiss, K.A., et al., *Multiple CD4+ T cell subsets produce immunomodulatory IL-10 during respiratory syncytial virus infection*. J Immunol, 2011. **187**(6): p. 3145-54.
103. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
104. Fagundes, C.T., et al., *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, 2011. **5**(12): p. e1449.
105. Ceballos-Olvera, I., et al., *JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol*. Virology, 2010. **396**(1): p. 30-6.
106. McLean, J.E., et al., *Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication*. J Biol Chem, 2011. **286**(25): p. 22147-59.
107. Hertoghs, K.M., et al., *Molecular profiling of cytomegalovirus-induced human CD8+ T cell differentiation*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 4077-90.
108. Kohlmeier, J.E., et al., *Inflammatory chemokine receptors regulate CD8(+) T cell contraction and memory generation following infection*. J Exp Med, 2011. **208**(8): p. 1621-34.
109. Yauch, L.E., et al., *A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4865-73.
110. Fonteneau, J.F., et al., *Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3520-6.
111. Graham, M.B., V.L. Braciale, and T.J. Braciale, *Influenza virus-specific CD4+ T helper type 2 T lymphocytes do not promote recovery from experimental virus infection*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1273-82.
112. Petitdemange, C., et al., *Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity*. PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002268.
113. Nattermann, J., *NK cells in acute hepatitis C*. J Hepatol, 2011. **55**(2): p. 265-7.