

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

Deborah Fernandes Valadão

**Participação da Fosfatidilinositol 3-quinase
y no modelo murino de infecção pelo
Dengue virus sorotipo 3**

Belo Horizonte
2013

Deborah Fernandes Valadão

**Participação da Fosfatidilinositol 3-quinase
γ no modelo murino de infecção pelo
Dengue virus sorotipo 3**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Danielle da Glória de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral

**Belo Horizonte
2013**

AGRADECIMENTOS

Dizer que este espaço é pequeno para tamanha gratidão parece até um clichê... Mas é exatamente assim que me sinto agora, no momento de escrever estes agradecimentos... São tantas histórias, tantas lembranças, tanto sentimento que eu queria colocar aqui, mas, se fosse colocar, iria precisar de muitas páginas!

E quando penso assim, me sinto ainda mais grata por ter vocês do meu lado em vários desses momentos... Cada um com sua contribuição, com alguma característica que me marca e sempre que eu me lembrar dessa pessoa, vai vir a memória essa característica.

A começar pelos meus pais, que tenho um amor imensurável. Souberam me apoiar, me entender e me ajudar nos momentos que mais precisei. Meu pai com esse jeito mais quieto mas sempre sábio, com a palavra certa para o momento certo. Queria eu ter um pouquinho que fosse dessa sabedoria. Minha mãe com uma alegria imensa, sempre disposta a ouvir tudo que eu tenho para falar, para desabafar. Essa dupla infalível soube como criar muito bem seus três filhos. E é também por esses dois outros filhos que tenho o mesmo sentimento. Aos meus irmãos, pelo amor e afeto constantes. Sem vocês quatro, nada disso seria possível!

Ao Marcelo, meu amor, por tudo que já vivemos e ainda vamos viver juntos. Pela paciência, pelo ombro amigo, pelo incentivo, por entender minhas escolhas, pelo amor que compartilhamos. Essa vitória é nossa, e é a primeira de muitas!

A professora Danielle, a quem minha gratidão será eterna. É um privilégio ser orientanda dela, uma professora extremamente competente e orientadora cobiçada, haja vista o tanto de alunos! Mas isso tem apenas uma explicação: ela é merecedora de tamanho reconhecimento. Com um carinho enorme por cada aluno, ela nos cativa com seu sorriso, com sua inteligência. Agradeço especialmente a você Dani, por me entender e me respeitar no momento que precisei. Pode ter certeza que nossa história não acabou por aqui!

Ao professor Flávio, o tio Flavinho! Também não sei como agradecer por tudo que você fez por mim em todos estes anos. Sempre carinhoso, atencioso, paciente, pode ter certeza que sua história está apenas começando. Seu futuro

é promissor, pois você tem capacidade para ir além e eu tenho a certeza de que irá.

Não posso deixar de agradecer a Vivi, minha tutora, minha conselheira. Você me ensinou a fazer ciência e o melhor, a ter amor pelo que faz. Assim como você me disse que será para sempre aluna do Flávio, eu te digo, serei para sempre, sua aluna!

Agradecer também ao Caio e ao Thiago, por participarem deste momento comigo, por me ajudarem a realizar este projeto. Ao Celso e a Raquel pela ajuda extra nos momentos finais.

Ao pessoal do Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro, em especial as minhas companheiras de marmita, Livinhas, Raquel, Renata, Lud e Ana Carol. Obrigada por fazerem do meu dia mais alegre, por me apoiarem. Sinto que, nestes cinco anos, fiz amigos de verdade! E é exatamente por isso que saio com o coração apertado, com um nó na garganta porque sei que não os verei todos os dias, mas o carinho por vocês continua só crescendo. Aprendi junto com vocês que não somos nada sozinhos, que para vencermos, precisamos ser uma equipe e foi exatamente isso que construímos! A partir de hoje, essa equipe estará com um jogador a menos diariamente, mas esse jogador será, para sempre, LIMHO de coração!

Ao professor Mauro Teixeira e Vanessa Pinho por me ajudarem e confiarem em mim! E ao pessoal do grupo Imunofarmacologia que a cada dia cresce mais e mais!

Aos mestres do departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais pelos ensinamentos, e aos componentes da banca, professores Vanessa Pinho, Jonatas Abrahão e Remo Russo por aceitarem o convite e contribuírem para a melhoria deste trabalho.

A todos vocês, o meu muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE - *antibody-dependent enhancement*- Intensificação dependente de anticorpos
AKT/PKB - *Protein kinase B*- Proteína quinase B
ALT - Alanina aminotransferase
AST - Aspartato aminotransferase
BSA - *Bovine serum albumin* – Albumina de soro bovino
C - Proteína do cerne
CCL() – Ligante de quimiocina CC
CCR()- Receptor de quimiocina CC
CETEA - Comitê de ética em experimentação animal
CLEC5A – Domínio do tipo Lectina-C membro A da superfamília 5
cm – centímetro (unidade de comprimento)
CXCL() – Ligante de quimiocina CXC
DC's - *dendritic cells*- Células dendríticas
DC-SIGN - *DC-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM3)-grabbing nonintegrin*
DENV - *Dengue virus*
DMEM - Meio Dulbecco Mem
E – Proteína do envelope
E.H – Edema de hepatócitos
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*- ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPM – Erro padrão médio
FD – Febre do dengue
FHD/SCD – Febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
HCV - *Hepatitis C virus*
HE - Hematoxilina de Harris e Eosina
HSP – *Heat shock proteins* - proteínas do choque térmico
HTAB - Brometo de hexadecyltrimethylammonium
i.c. – intracerebral
i.p. – intraperitoneal
ICAM- 3 - Intercellular adhesion molecule 3
IFN γ – Interferon- γ
IL-() – Interleucina
LPA – Peptídeos ligantes alterados
MCP-1 - Monocyte chemotactic protein-1
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MIF - Fator de Inibição da Migração de Macrófagos
mL – microlitro (unidade de volume)
mM – micromolar
MPO - Mieloperoxidase
MR- *Manose receptor*
NaCl – Cloreto de sódio

NF- κ B- *Nuclear factor Kappa B* – Fator nuclear Kappa B
NI – Não infectado
NK – *Natural Killer*
NO – Óxido Nítrico
NS (-) - Nonstructural protein – Proteína não estrutural
OD – Optical density – densidade óptica
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPD - *o-phenylenediamine 47 dihydrochloride*
p/v – peso/volume
PAFR – Receptor do fator de agregação plaquetária
PBS – phosphate-buffered saline
PDK-1 - proteína quinase dependente de fosfatidilinositol- 1
PFU – Plaque forming unit- unidade formadora de placa
PH – Pleckstrin Homology domain
PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase
prM – Proteína pré Membrana
PRR - Receptores de Reconhecimento do Padrão
PtdIns (3,4) P2 - Fosfatidilinositol(3,4)-bifosfato
PtdIns (3,4,5) P3 - Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PTEN - *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RPM – Rotação por minuto
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SFB - Soro fetal bovino
SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde
TBS - Solução salina Tris-tamponada
TNF- α – *Tumor necrosis factor-alfa* – Fator de necrose tumoral alfa
v/v – volume/volume
VEJ - Japanese encephalitis virus
WT – Wild Type
XIX – século 19
XVIII – século 18
XX – século 20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Composição da partícula viral de Dengue virus	24
Figura 2: Ciclo de multiplicação dos Flavivirus.....	31
Figura 3: Classificação dos casos de dengue e os níveis de severidade.....	33
Figura 4: Fatores que influenciam no desenvolvimento da doença no hospedeiro.....	35
Figura 5: Representação esquemática das classes IA e IB da via da PI3K.	39
Figura 6: Representação esquemática da ativação e ação de PI3K	42
Figura 7: Ativação da via da PI3K γ após infecção pelo DENV-3.....	58
Figura 8: Taxa de letalidade induzida pela infecção pelo sorotipo 3 do Dengue virus em camundongos PI3K γ ^{-/-} e WT.....	59
Figura 9: Análise dos parâmetros hematológicos induzida pela infecção pelo DENV-3 em camundongos PI3K γ ^{-/-} e selvagens (WT).....	60
Figura 10: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase no baço, fígado e pulmões dos camundongos PI3K γ ^{-/-} e selvagens (WT) infectados com DENV-3.	61
Figura 11: Quantificação da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α , IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no baço e no soro dos camundongos PI3K γ ^{-/-} e WT infectados com DENV-3.....	62
Figura 12: Análise dos danos hepáticos induzidos pela infecção pelo DENV-3 em camundongos PI3K γ ^{-/-} e selvagens (WT).....	63
Figura 13: Verificação da carga viral no sangue, baço e fígado dos camundongos PI3K γ ^{-/-} e WT infectados com DENV-3	64
Figura 14: Verificação da presença da proteína viral não-estrutural NS3 no fígado dos camundongos PI3K γ ^{-/-} e WT infectados com DENV-3.....	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Incidência de casos de dengue e correlação com sorotipo circulante no Brasil..	28
--	----

SUMÁRIO

	Conteúdo
RESUMO.....	16
ABSTRACT	19
REVISÃO DE LITERATURA	22
<i>Dengue virus</i>	23
Epidemiologia	25
Ciclo de transmissão do vírus	28
Ciclo de multiplicação viral.....	29
Patogênese.....	33
Fosfatidilinositol 3 quinases	37
JUSTIFICATIVA	43
OBJETIVOS	45
Objetivo geral.....	46
Objetivos específicos	46
MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
Vírus	48
Titulação do vírus da Dengue	48
Animais e protocolo experimental.....	49
Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes	49
Análise do índice de hematócrito	50
Determinação dos níveis de citocinas	50
Dosagem de mieloperoxidase (MPO).....	51
Avaliação dos níveis das Transaminases Hepáticas no soro	52
Análises Histopatológicas	53
Western Blot	54
Análise estatística	55
Pesquisa bibliográfica.....	55
RESULTADOS	57
CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

RESUMO

A dengue é uma das mais importantes arboviroses que acometem o homem na atualidade. Trata-se de grande problema de saúde pública, dado que nas últimas décadas a incidência de doença causada pelos *Dengue virus* (DENV) tem aumentado significativamente. A transmissão ocorre através da picada do mosquito-vetor do gênero *Aedes*, com destaque para o *Aedes aegypti*. A infecção por DENV caracteriza-se por sintomatologia inespecífica e o tratamento é apenas sintomático. No decorrer da infecção, há a ativação do sistema imune do hospedeiro, com destaque para a indução de uma grande variedade de moléculas antivirais e de vias de sinalização. A via das Fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks) é uma delas. Esta via é responsável pela fosforilação do grupamento fosfato da molécula e fosfatidilinositol, tendo várias funções no organismo, dentre elas, as relacionadas ao processo inflamatório, como a proliferação, o desenvolvimento e a migração celular. As PI3Ks são divididas em três classes, sendo a classe IB o alvo deste projeto. Esta classe é composta unicamente pela PI3K γ , que está intimamente relacionada à inflamação. Para se estudar o efeito desta via durante a patogênese da dengue experimental, utilizamos animais adultos selvagens (WT) e deficientes para a PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$). Os animais foram infectados com o sorotipo 3 do vírus (DENV-3) e, após a infecção, verificamos a ativação do principal alvo da via da PI3K, NF- κ B, e a fosforilação de AKT. Além disso, avaliamos a taxa de letalidade e os parâmetros clínicos (hematócrito, plaquetas, produção e liberação de citocinas e quimiocina, infiltrado neutrofílico, dano hepático) e quantificação da carga viral após a infecção. Os animais selvagens (WT) desenvolveram os sinais clínicos característicos da doença humana: trombocitopenia e hemoconcentração, além de lesão tecidual no fígado, observado através da histologia e do escore de lesão e dosagem do nível das transaminases hepáticas. Além disso, apresentaram também uma produção elevada de citocinas e quimiocina, assim como um significativo infiltrado neutrofílico para órgãos-alvo da doença, como fígado e baço. Os animais PI3K $\gamma^{-/-}$, por sua vez, não apresentaram trombocitopenia e não desenvolveram hemoconcentração. Também apresentaram menores níveis de transaminases hepáticas, menor escore de lesão, menor alteração na morfologia hepática, além de menor infiltrado neutrofílico e menor produção de quimiocinas e citocinas. Vale ressaltar também que os animais PI3K $\gamma^{-/-}$ apresentaram uma carga viral

consideravelmente menor no fígado, baço e sangue quando comparada a encontrada nos animais WT infectados. Somando-se aos dados apresentados, observou-se uma taxa de letalidade reduzida nos animais PI3K γ ^{-/-}, o que nos permite inferir que animais deficientes para PI3K γ são protegidos de uma doença grave.

Palavras-chave: *Dengue virus*, inflamação, PI3K γ .

ABSTRACT

Dengue is one of the most important mosquito-borne diseases affecting humans nowadays. It has become a great concern to public health system, given the incidence of the disease caused by dengue virus (DENV) has increased at an alarming rate in the last decades. Dengue transmission occurs through the bite of *Aedes* mosquitoes, especially *Aedes aegypti*. DENV infection is characterized by non-specific symptoms and treatment is only symptomatic. During the course of infection, immune system is activated and there is induction of a wide variety of antiviral and virus-supportive signaling pathways, among them, the Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway. PI3K activation catalyzes phosphorylation of inositol group in the phosphatidylinositol molecule, and present several functions in the body, such as proliferation and cell migration. The PI3Ks are classified into three classes, and the subject of this study is IB class. This class is composed solely by PI3K γ , which is related to inflammation. In order to study the role of this kinase in the pathogenesis of experimental dengue, we used adult wild type (WT) mice or mice deficient to PI3K γ (PI3K γ ^{-/-}). Mice were infected with dengue virus serotype 3 (DENV-3) and, after infection, we looked for PI3K pathway activation, through evaluation of AKT and NF- κ B phosphorylation. In addition, lethality rates and dengue disease signals (hematocrit, platelets counts, production and release of cytokines and chemokine, neutrophil infiltration and analyses of liver damage and viral load) were evaluated after infection. It was observed that PI3K γ pathway is activated during infection, once AKT and NF- κ B phosphorylation occurred. WT animals developed characteristic clinical signs of human disease, including thrombocytopenia, hemoconcentration, and tissue damage in liver, observed by histology and lesion score and high levels of hepatic transaminases in serum. In addition, also showed a higher production of cytokines and chemokine as well as a significant neutrophil infiltrate target organ disease such as liver and spleen. The animals PI3K γ ^{-/-} animals, in turn, showed no reduction in the number of circulating platelets and did not develop hemoconcentration. They also had lower levels of hepatic transaminases, lowest score of injury, minor changes in liver morphology, and lower neutrophil infiltration and reduced production of cytokines and chemokine when compared with infected WT mice. It is noteworthy also that animals PI3K γ ^{-/-} showed a significantly lower viral load in the liver, spleen and blood when compared to

found in WT infected animals. In addition to the data presented, there was a reduced mortality rate in PI3K γ ^{-/-} animals, which allows us to infer that PI3K γ deficient mice are protected from serious illness.

Keywords: *Dengue virus*, inflammation, PI3K γ .

REVISÃO DE LITERATURA

Dengue vírus

A dengue é a arbovirose emergente com maior número de notificações nos últimos anos no mundo, com destaque para o Brasil. Transmitida ao homem através da picada do mosquito contaminado do gênero *Aedes*, com destaque para o *Aedes aegypti*, acomete grande parte do globo terrestre, concentrando-se, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais. O número de casos de infecção pelo *Dengue vírus* (DENV) vem crescendo em uma taxa alarmante, chegando a colocar aproximadamente três bilhões de pessoas sob risco de infecção (GUZMAN *et al.*, 2010), que pode causar um amplo espectro de doença, indo desde a forma mais branda até o desenvolvimento de uma dengue grave (ROSS, 2010).

O DENV é classificado como pertencente à família *Flaviviridae*, a qual é composta por vírus causadores de encefalites e os vírus vicerotrópicos, no qual encaixa-se o DENV, e pertence ao gênero *Flavivirus* que abrange diversos outros vírus de relevância na saúde como vírus da Febre Amarela (*Yellow fever virus*), vírus West Nile (*West Nile virus*), vírus da Hepatite C (*Hepatite C vírus- HCV*) e o vírus da Encefalite Japonesa (*Japanese encephalitis virus- VEJ*). Assim como os demais membros deste gênero, o DENV é composto por uma partícula pequena, de simetria icosaédrica, envelopada, contendo genoma de RNA de fita simples, de sentido positivo, que penetra na célula hospedeira através de um processo de endocitose mediada por receptor (LIGON, 2005; SMIT *et al.*, 2011). Dando início ao processo de replicação do genoma, origina-se uma grande poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais: Cerne (C), pré-Membrana (prM) e envelope (E) e sete não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (CLYDE *et al.*, 2006; KURANE, 2007; MURRAY *et al.*, 2008; ROSS, 2010) (Figura 1). Acredita-se que algumas propriedades biológicas do vírus como sua interação com receptores, indução de anticorpos neutralizantes e proteção contra resposta imune do hospedeiro, estejam associados à presença da glicoproteína E (GUZMAN *et al.*, 2010).

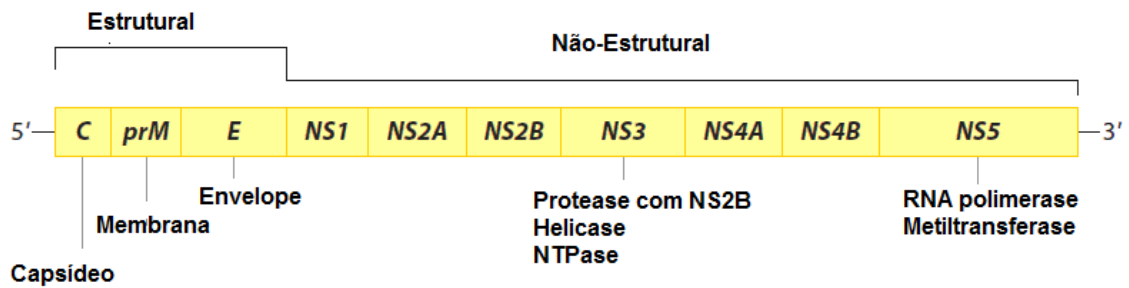


Figura 1: Composição da partícula viral de Dengue virus. Representação esquemática do genoma do DENV. A tradução do genoma gera uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares, gerando três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais. **Fonte:** Modificado da versão original publicada por MURPHY, B.R., WHITEHEAD, S.S.. Immune Response to Dengue virus and prospects for a vaccine. Annual Reviews Immunology, v.29, p.587-619, 2011.

Com uma relativa homologia entre as sequências, o DENV é dividido em quatro sorotipos distintos (DENV 1-4), classificados de acordo com a ordem de descoberta. Cada sorotipo é subdividido em genótipos, baseado na diferença na sequência de genes como o do envelope (KYLE & HARRIS, 2008). Segundo BALMASEDA *et al.*, 2006, alguns sorotipos, como 2 e 4 são mais susceptíveis a causar infecções mais graves quando presentes em uma segunda infecção, embora o DENV-4, quando agente de uma infecção primária, comumente leva ao desenvolvimento de uma doença mais branda. Não se sabe ao certo se cada sorotipo possui características específicas que poderiam influenciar na gravidade da doença, como um processo de multiplicação viral mais eficiente em algumas cepas de DENV-2, ou o aumento de casos graves da doença em algumas regiões onde genótipos específicos de DENV-3 circulariam (KYLE & HARRIS, 2008). Outro estudo, realizado por BALMASEDA *et al.*, 2006, relata que, durante surtos dos sorotipos 1 e 2 de DENV em Nicarágua, observou-se, nos pacientes acompanhados, manifestações clínicas mais frequentes quando infectados com DENV-1, em contrapartida, o DENV-2 foi capaz de causar infecções mais graves, com alto índice de desenvolvimento de dengue grave.

O motivo do desenvolvimento da forma grave da doença não está totalmente elucidado, apesar de algumas hipóteses já terem fundamento. Segundo (PICHYANGKUL *et al.*, 2003; FAGUNDES *et al.*, 2011b; Costa *et al.*, submitted) a resposta imune do hospedeiro desempenha papel importante na

determinação da gravidade da doença. De acordo com FAGUNDES *et al.*, 2011b, as citocinas, por exemplo, tem um papel direto na patogênese da dengue, como efeitos pró-inflamatórios que atuam aumentando a permeabilidade vascular. Os autores relacionam ainda a provável contribuição dessas citocinas para a gravidade da doença, através de sinais como disfunção hepática, hipotensão, trombocitopenia e choque hemorrágico. A infecção por um sorotipo dos DENV resulta em imunidade permanente contra esse sorotipo, mas apenas imunidade temporária para os demais sorotipos. Segundo HALSTEAD *et al.*, 2010, infecções iniciais primárias podem aumentar a reação cruzada de anticorpos não neutralizantes, que podem agravar a resposta contra um sorotipo diferente. Na maioria dos estudos, os casos de infecção secundária heteróloga por qualquer dos quatro sorotipos dos DENV continua a ser um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento da forma grave da doença (KYLE & HARRIS, 2008).

Epidemiologia

De acordo com KYLE & HARRIS, 2008; GUZMAN *et al.*, 2010, o aumento da população, a urbanização descontrolada e também pessoas que viajam para áreas de risco e são consideradas vetores, são uma das causas da rápida e crescente expansão de áreas geográficas acometidas pelo *Dengue virus*.

Os primeiros relatos da doença provocada pelo DENV ocorreram na China, mencionados em uma Enciclopédia Médica Chinesa datada de 992 d.C. (KYLE & HARRIS, 2008). Todavia, foi apenas em 1779/80, que de fato, ocorreram os primeiros relatos de uma epidemia bem documentada, ocorrida em três continentes (Ásia, África e América do Norte). A doença foi chamada de “veneno da água” pelos chineses que acreditavam estar ligada de alguma forma a insetos associados à água. Em 1780, Benjamim Rush descreveu uma epidemia então denominada “febre quebra-ossos”, onde os pacientes apresentavam febre, dor de cabeça, náusea, vômitos, intensas dores musculares e articulares, além de manifestações hemorrágicas. Uma síndrome similar foi descrita em Madrid um pouco mais tarde em 1801, e recebeu o nome de “Dengue” (que em espanhol significa “melindre”, “manha”) (MONATH,

1994). O nome faz referência ao estado de moleza e prostração em que fica o indivíduo doente. No entanto, é aceito que no final do século XVIII, uma doença caracterizada como dengue causara epidemias intermitentes na Ásia (Java) e nos EUA (Filadélfia); e entre os séculos XIX e XX, o vírus se disseminou pelas áreas tropicais e subtropicais do globo terrestre (MONATH, 1994). Os DENV-1 e DENV-2 foram os primeiros sorotipos a serem identificados, seguidos pelo DENV-3 e DENV-4 quando a forma grave da doença surgiu nos centros urbanos das Filipinas e Tailândia em 1954 (KYLE & HARRIS, 2008). Uma hipótese para a expansão viral é de que o movimento das tropas que lutaram durante a II Guerra Mundial seja um dos fatores que tenha contribuído, o que reforça a teoria da contribuição dos viajantes.

Durante o século XIX, a dengue foi considerada uma doença esporádica, causando epidemias em longos intervalos (MALAVIGE *et al.*, 2004). A primeira epidemia documentada ocorrida na América Latina foi em Cuba, em 1977, causada pelo DENV-1, seguida por um surto de dengue grave, em 1981, devido à introdução do DENV-2. Há relatos que cerca de 98% desses casos eram de infecção secundária (MALAVIGE *et al.*, 2004). Nas últimas décadas, observou-se um aumento significativo na incidência de dengue na América. Segundo ROSS, 2010, uma grande campanha para a erradicação dos mosquitos vetores foi feita em 1950-60, pela Organização Panamericana de saúde, para a diminuição do número de casos de Febre Amarela. Porém, essa campanha foi descontinuada em diversos países do Hemisfério Ocidental, o que permitiu a reinfestação do continente Americano por volta de 1980-90.

Hoje, a dengue é uma das doenças que mais preocupa o sistema de saúde do nosso país. Campanhas de erradicação do mosquito do gênero *Aedes* têm sido feitas, porém não tem sido eficazes, uma vez que a transmissão do vírus continua, principalmente em regiões endêmicas (SIMMONS *et al.*, 2012). Mundialmente, estima-se que cerca de 2,5 a 3,0 bilhões de pessoas estão em risco de serem infectadas e destas, cerca de 975 milhões vivem em áreas urbanas em regiões tropicais e países sub-tropicais do sudeste da Ásia, Pacífico e das Américas (GUZMAN *et al.*, 2010). Nesse alto número de casos de dengue estimados, inclui-se mais de 500.000 casos potencialmente fatais (HOLMES & TWIDDY, 2003; KURANE, 2007; KYLE & HARRIS, 2008; GUZMAN *et al.*, 2010; SIMMONS *et al.*, 2012).

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), até novembro de 2012, foram notificados 565.510 casos de dengue no Brasil, registrando uma queda de 22% em comparação com o mesmo período em 2011 (727.803 casos). A SVS divulgou ainda que houve uma redução de cerca de 64% no número de casos graves da doença em relação a 2011, sendo que o número de óbitos também reduziu em até 49%. O Rio de Janeiro foi o estado com maior número de casos notificados, com 179.518, seguido pelo Ceará (54.591 casos) e Bahia (48.653 casos). Minas Gerais é o nono estado que concentra o maior número de notificações, com 23.771 casos notificados.

O governo atribui essa diminuição ao sucesso das campanhas de prevenção da doença, como combate ao vetor, investimento no atendimento aos doentes e incentivo fiscal aos municípios. Ainda, a diminuição do índice de chuvas contribuiu para a redução da proliferação do mosquito vetor, com consequente diminuição no número de casos.

Entretanto, um fator preocupante é o aumento alarmante de detecção do DENV-4 em diversos estados do país (Tabela 1). Com isso, o risco de epidemias aumenta, uma vez que não tinha registro atual de circulação deste sorotipo no país até 2010.

UF	Amostras enviadas	Amostras positivas	% Positividade	%DENV1	%DENV2	%DENV3	%DENV4
Brasil	8.160	2.098	25,7	36,4	4,1	0,2	59,3
Norte	914	249	27,2	8,8	5,6	0,0	85,5
Rondônia	20	11	55,0	100,0	0,0	0,0	0,0
Acre	180	11	6,1	0,0	0,0	0,0	100,0
Amazonas	36	1	2,8	0,0	0,0	0,0	100,0
Roraima	5	4	80,0	0,0	25,0	0,0	75,0
Pará	633	207	32,7	5,3	6,3	0,0	88,4
Amapá	6	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tocantins	34	15	44,1	0,0	0,0	0,0	100,0
Nordeste	2385	531	22,3	16,8	0,9	0,8	81,5
Maranhão	26	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Piauí	52	13	25,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Ceará	546	16	2,9	6,3	0,0	0,0	93,8
Rio Grande do Norte	238	54	22,7	1,9	0,0	0,0	98,1
Paraíba	76	14	18,4	64,3	7,1	7,1	21,4
Pernambuco	327	60	18,3	20,0	1,7	3,3	75,0
Alagoas	31	9	29,0	33,3	22,2	0,0	44,4
Sergipe	79	23	29,1	13,0	0,0	0,0	87,0
Bahia	1010	342	33,9	17,5	0,3	0,3	81,9
Sudeste	2475	945	38,2	46,8	3,4	0,1	49,7
Minas Gerais	311	32	10,3	81,3	0,0	0,0	18,8
Espírito Santo	267	44	16,5	79,5	13,6	0,0	6,8
Rio de Janeiro	1062	471	44,4	22,9	0,0	0,2	76,9
São Paulo	835	398	47,7	68,6	6,5	0,0	24,9
Sul	130	37	28,5	83,8	2,7	0,0	13,5
Paraná	104	26	25,0	96,2	3,8	0,0	0,0
Santa Catarina	1	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rio Grande do Sul	25	11	44,0	54,5	0,0	0,0	45,5
Centro-oeste	2256	336	14,9	53,3	10,1	0,0	36,6
Mato Grosso do Sul	366	79	21,6	31,6	40,5	0,0	27,8
Mato Grosso	179	80	44,7	3,8	0,0	0,0	96,3
Goiás	1667	175	10,5	85,7	1,1	0,0	13,1
Distrito Federal	44	2	4,5	50,0	0,0	0,0	50,0

Tabela 1: Incidência de casos de dengue e correlação com sorotipo circulante no Brasil. Representação do número de amostras enviadas para testes de DENV e a incidência de acordo com o sorotipo circulante.

Fonte: Balanço da Dengue. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil, maio de 2012.

Ciclo de transmissão do vírus

O DENV é transmitido aos humanos através da picada da fêmea do mosquito vetor. O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor mais comumente relacionado com a transmissão da doença, sendo o responsável pela transmissão do vírus principalmente em ambiente urbano, enquanto o *A. albopictus*, também responsável pela infecção, está mais presente em infecções em ambientes silvestres. O modo de infecção mais significativo ocorre através do ciclo humano-mosquito-humano, o qual tem início a partir da picada do mosquito a um hospedeiro infectado, onde o vírus presente na circulação é ingerido pelo artrópode (WHITEHEAD *et al.*, 2007). Outra possível

forma de transmissão viral no mosquito é o que chamamos de transmissão vertical, na qual a fêmea infectada transmite o vírus aos ovos, o que dará origem a larvas já infectadas com o DENV. Uma vez dentro do mosquito, o vírus se multiplica no intestino médio e, após um período de aproximadamente dez dias, são encontrados vírions também no ovário, sistema nervoso e nas glândulas salivares. Quando o mosquito infectado pica o hospedeiro, a transmissão viral ocorrerá através da saliva do mosquito (GUZMAN *et al.*, 2010). Uma vez presente na circulação sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado, o vírus passa a se multiplicar em células permissivas de órgãos específicos, como o baço, fígado e tecidos linfáticos (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Ciclo de multiplicação viral

O ciclo de multiplicação do *Dengue virus* tem início quando o vírus infecta uma célula hospedeira permissiva. O DENV tem tropismo por um amplo espectro de células humanas e o principal alvo da infecção pelo vírus ainda é controverso (CLYDE *et al.*, 2006). As células de Langerhans, células dendríticas (DC's) intersticiais e os monócitos/macrófagos são vistos como alvos primários da infecção pelo DENV no local da picada do mosquito (TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003; CLYDE *et al.*, 2006; FAGUNDES *et al.*, 2011b). Segundo RODRIGUEZ-MADOZ *et al.*, 2010, as DC's são ativadas logo após a detecção do patógeno e migram para os linfonodos, onde ativam células TCD4+ e TCD8+. Existem ainda evidências de que o vírus também é capaz de infectar linfócitos B, linfócitos T, células *Natural killer* (NK), hepatócitos, neurônios, macrófagos alveolares e células de Kupffer (CLYDE *et al.*, 2006).

Um único vírion pode originar, em uma única célula hospedeira, desde alguns até milhares de partículas virais semelhantes. O contato do vírion com a célula hospedeira dá-se através dos fatores virais de ligação (presentes na superfície do vírion) aos receptores presentes nas células hospedeiras, os quais irão mediar a adsorção do vírus a estas células. Segundo ACOSTA *et al.*, 2009, a glicoproteína E, presente no envelope, foi identificada como uma das proteínas virais envolvidas no processo de ligação e penetração da partícula

viral. Em contrapartida, a identidade do receptor celular que interage com glicoproteína E é, atualmente, controversa, com uma longa lista de possíveis receptores, incluindo o Heparan sulfato (CHEN *et al.*, 1997; GERMI *et al.*, 2002), as proteínas do choque térmico (HSP) 70 e 90 (CHAVEZ-SALINAS *et al.*, 2008), domínio do tipo Lectina-C membro A da superfamília 5 (CLEC5A) (CHEUNG *et al.*, 2011), o DC-SIGN (DC specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM3)-grabbing nonintegrin) e o ICAM-3-grabbing nonintegrin, específico do fígado/linfonodos (CHEN *et al.*, 1997; LOZACH *et al.*, 2005; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003; CLYDE *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que o receptor DC-SIGN é capaz de mediar infecção pelos quatro sorotipos do DENV e que a expressão ectópica deste receptor confere permissividade à infecção sob linhagens celulares normalmente não-permissivas (TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003). Um outro receptor, o receptor de Manose (MR), presente principalmente em monócitos e macrófagos, também foi demonstrado, através de experimentos *in vitro* em macrófagos, ser capaz de mediar a infecção pelos quatro sorotipos do DENV, especificamente pela ligação a glicoproteína do envelope. Os autores confirmaram o importante papel deste receptor através do bloqueio do mesmo por anticorpos específicos que impediram a infecção (MILLER *et al.*, 2008).

O DENV tem como mecanismo de penetração, a endocitose mediada por receptor (SMIT *et al.*, 2011). Tem sido proposto que este processo envolve dois ou mais receptores da célula-alvo: um receptor ubíquo, de baixa afinidade, como o DC-SIGN que inicialmente captura o vírion para a superfície celular, aumentando assim a concentração local de vírus, e um co-receptor, de alta afinidade, o qual medeia a internalização do vírion (CLYDE *et al.*, 2006). Após a endocitose, o ambiente ácido do endossoma dispara um processo reversível de trimerização da proteína E, o que resulta na fusão das membranas celular (endossomal) e viral (CLYDE *et al.*, 2006). O cerne viral é então liberado no citoplasma da célula alvo e, em seguida, ocorre a dissociação do capsídeo protéico do genoma de RNA, processo denominado desnudamento (NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2005).

A própria fita de RNA senso positivo é traduzida em uma grande poliproteína que, por sua vez, dá origem a polimerase dependente de RNA. Durante o processo de replicação, cópias de uma fita intermediária de RNA de

sentido negativo são produzidas e estas servem como molde para a produção de múltiplas cópias da fita de RNA viral sentido positivo. A replicação do RNA de fita positiva ocorre em associação com as membranas derivadas do retículo endoplasmático (CLYDE *et al.*, 2006). Após vários ciclos de tradução, níveis elevados das proteínas C, prM e E são sintetizadas. Estas proteínas são arranjadas juntamente com o genoma viral nas membranas do retículo endoplasmático da célula hospedeira, dando origem à progênie de vírions, que são transportados pelo complexo de Golgi e secretados posteriormente pelo processo de exocitose (CLYDE *et al.*, 2006; MURRAY *et al.*, 2008).

A duração deste ciclo, esquematizado na Figura 2, varia de quatro a sete dias, período que coincide com o aparecimento dos primeiros sintomas na infecção humana (NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2005; CLYDE *et al.*, 2006).

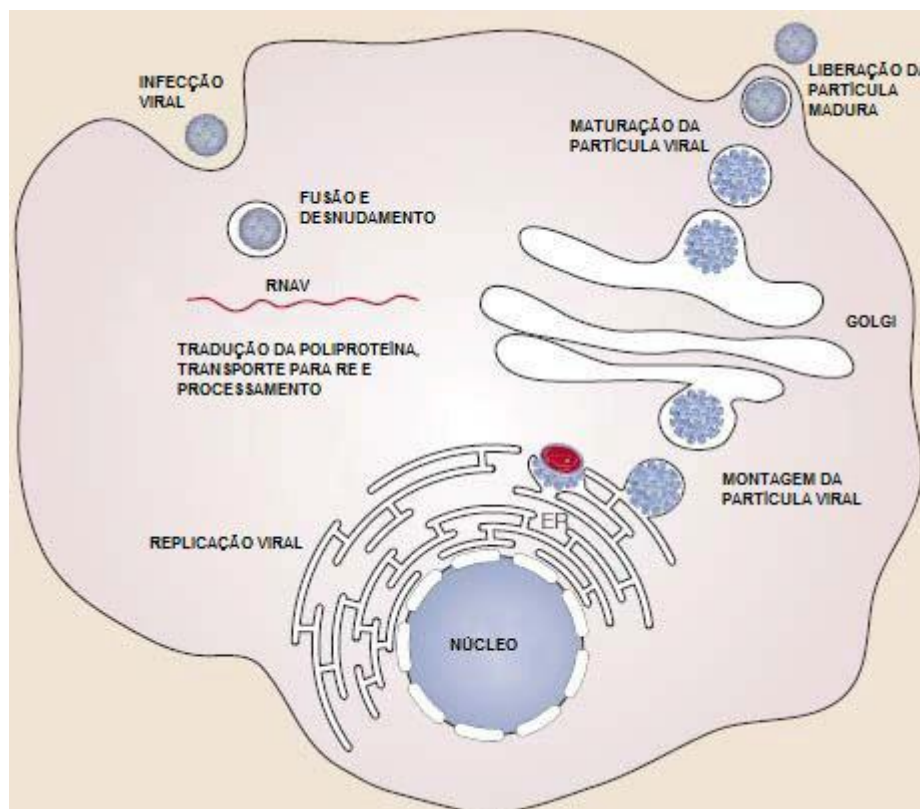


Figura 2: Ciclo de multiplicação dos Flavivirus. O vírion liga-se e penetra na célula através da mediação de receptor (endocitose). Após esta penetração, ocorre o desnudamento no citoplasma, com replicação do genoma viral e síntese da grande poliproteína no Retículo Endoplasmático. A partícula viral é então transportada para o Complexo de Golgi, no qual ocorre a montagem da partícula viral e liberação da célula (exocitose).

Fonte: Modificado da versão original publicada por WHITEHEAD, S.S; et al. *Nature Microbiology Reviews*. v.5 p. 518-528, 2007

De acordo com MCLEAN *et al.*, 2011, as sete proteínas não-estruturais estão envolvidas na replicação, montagem e evasão do sistema imune. Dentre elas, as mais extensivamente bem caracterizadas são a NS3, sua coenzima NS2B, a NS1 e NS5. A glicoproteína NS1 parece ser essencial para a viabilidade do vírus. Ela é expressa sob três formas: uma forma residente no retículo endoplasmático envolvida no complexo de multiplicação viral, uma forma ancorada à membrana e uma última forma que é secretada da célula. NS1 é glicosilada em dois sítios, N130 e N207, e foi demonstrado recentemente que a glicosilação de ambos resíduos é necessária para o processo de multiplicação do vírus em células de mosquito e para a neurovirulência em camundongos. A NS1 é considerada um alvo dominante da imunidade humoral e pode desempenhar um importante papel na patogênese da doença (CLYDE *et al.*, 2006). As proteínas E e NS1 são conhecidas como as mais imunogênicas das proteínas do DENV (ROTHMAN, 2004). Foi observado que células infectadas pelo DENV expressam NS1 na membrana e também a liberam para o meio extracelular, induzindo o recrutamento de células inflamatórias, como por exemplo, neutrófilos e macrófagos, e estes, por sua vez, começam a liberar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que potencializam os processos inflamatórios (CHATURVEDI *et al.*, 2000).

A proteína NS3 exibe atividade de protease, trifosfatase de nucleosídeos (NTPase), helicase, e atividades de trifosfatase de RNA (MCLEAN *et al.*, 2011). Estudos mostram que as proteínas virais M e NS3 têm sido relacionadas com atividade pró-apoptótica, sendo o processo de apoptose sugerido como um dos mecanismos pelo qual a infecção pelos DENV pode causar morte celular e posterior propagação viral para as células vizinhas ainda não-infectadas (revisado por CLYDE *et al.*, 2006). Já a proteína NS5 atua como RNA polimerase dependente de RNA, bem como uma metiltransferase, outra enzima essencial envolvida na via de *capping*. As proteínas NS3 e NS5 têm sido relatadas como as proteínas não-estruturais de alvo preferido para o desenvolvimento de drogas antivirais (YIN *et al.*, 2009). Ainda, NS2A está diretamente associada com a montagem do vírion, enquanto NS4A associa-se com o complexo de replicação viral e induz o rearranjo na membrana do retículo endoplasmático enquanto NS4B é descrita como antagonista de Interferon (MCLEAN *et al.*, 2011).

Patogênese

Infecções por DENV causam um amplo espectro de formas clínicas, que variam desde formas brandas à graves (ROSS, 2010). A Organização Mundial de saúde (OMS), em 1975, classificou a dengue em três tipos, de acordo com a sua gravidade: infecção assintomática, a febre do dengue (FD), caracterizada como a forma clássica da doença, e a febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque do dengue (FHD/SCD). No entanto, essa classificação apresentava falhas quando aplicada mundialmente, uma vez que as características da doença apresentavam variações de acordo com a região geográfica e com a faixa etária, por exemplo (BALMASEDA *et al.*, 2005; WIETEN *et al.*, 2012). ALEXANDER *et al.*, 2011, propuseram então uma nova classificação, que foi incorporada pela OMS. Esta nova classificação da dengue ocorre de acordo com a gravidade da doença, abrangendo dengue com ou sem sinais de alerta e dengue grave (Figura 3) Vale ressaltar que as duas classificações são utilizadas atualmente, visto que as duas apresentam déficits em determinados pontos (WIETEN *et al.*, 2012; OMS, 2009).

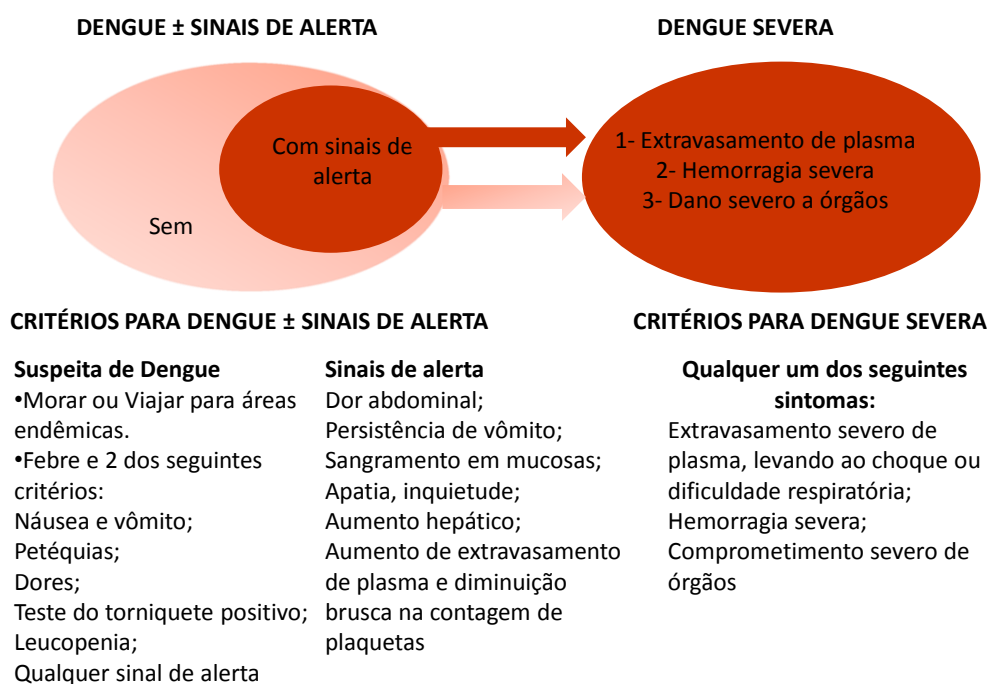


Figura 3: Classificação dos casos de dengue e os níveis de severidade. A dengue é classificada como dengue com ou sem sinais de alerta e dengue severa. O diagnóstico de

dengue requer a presença de febre com dois ou mais achados clínicos ou sinais de alerta. Evidências clínicas e laboratoriais são requeridas para o diagnóstico preciso da doença.

Fonte: Modificado da versão original publicada por World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, 2009.

Na maior parte dos casos (50-90% de todos os casos de dengue), a doença manifesta-se como uma infecção assintomática (HOLMES & TWIDDY, 2003; KYLE & HARRIS, 2008). A probabilidade de ser dengue surge a partir de uma sintomatologia inespecífica com febre associada a dois ou mais sintomas como náusea, vômitos, presença de petéquias, dores como cefaleia, dor retro-orbital, mialgia e resultado positivo para o teste do torniquete. Quando ocorre um ou mais sinais de alerta, é necessário o acompanhamento clínico, pois qualquer caso de dengue pode desenvolver para a forma grave da doença, podendo levar ao óbito (WIETEN *et al.*, 2012).

Quando a doença apresenta-se branda, normalmente a recuperação é rápida, com variação de uma ou duas semanas após o início da febre e a mortalidade durante a infecção primária é rara (KAWAGUCHI *et al.*, 2003; WHITEHEAD *et al.*, 2007).

A forma mais grave da doença, dengue severa ou ainda chamada de FHD/SCD desenvolve-se de forma similar ao que é chamado de dengue ou FD, com sintomatologia similar, porém, a partir do segundo ou terceiro dia do início dos sintomas da doença começam os fenômenos hemorrágicos, que se manifestam principalmente na pele e no trato gastro-intestinal, além de sinais característicos como plaquetopenia e o aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente extravasamento plasmático (DEEN *et al.*, 2006). Diversos fatores influenciam no desenvolvimento da forma grave da doença (Figura 4). Segundo WELSH & ROTHMAN, 2003; MURPHY & WHITEHEAD, 2011; Costa *et al.*, submitted), uma das hipóteses mais aceitas para o porquê da ocorrência da forma severa da doença consiste em uma reatividade cruzada de anticorpos quando há uma segunda infecção provocada por um sorotipo heterólogo ao da primeira infecção, fenômeno esse conhecido como *Antibody-Dependent Enhancement* (ADE, em português, resposta intensificada por anticorpos). Neste caso, os anticorpos gerados pela primeira infecção encontram-se em níveis não-neutralizantes, que poderiam aumentar a penetração das partículas

virais em células fagocíticas e comprometer a resposta imune do hospedeiro. O choque devido a doença ocorre quando o extravasamento plasmático nos espaços intersticiais é tão intenso que resulta em choque hipovolêmico podendo levar ao óbito do paciente, na ausência de tratamento rápido e apropriado (HOLMES & TWIDDY, 2003; KYLE & HARRIS, 2008). Elevados níveis das enzimas hepáticas (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase - AST) são comuns quando há um comprometimento hepático durante a infecção, assim como a hepatomegalia pode ocorrer nos casos mais graves (YAUCH & SHRESTA, 2008).

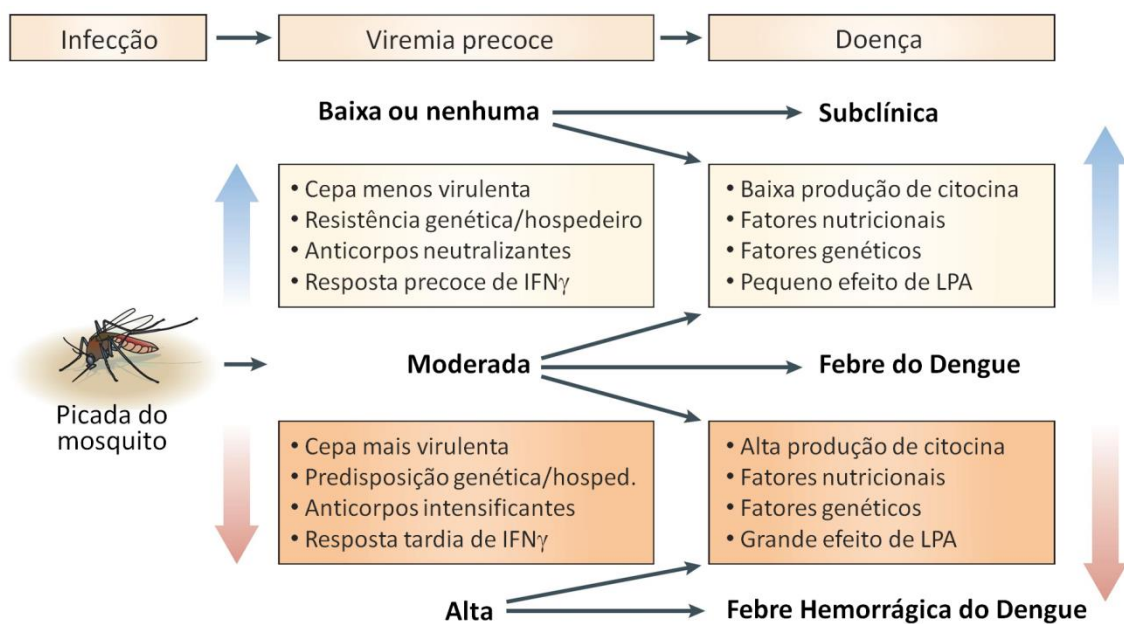


Figura 4: Fatores que influenciam no desenvolvimento da doença no hospedeiro. A inoculação do vírus pelo mosquito *A. aegypti* resulta na disseminação viral, que por sua vez, resulta em manifestações da doença; alto título viral é necessário mas não suficiente para causar doença grave. Fatores virais e do hospedeiro afetam a multiplicação viral inicial e influenciam no nível de viremia. Outros fatores relacionados ao hospedeiro podem afetar os níveis de produção de várias citocinas (tais como interferon- γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α)) e determinar a gravidade da doença para qualquer nível de viremia. LPA: Peptídeos ligantes alterados.

Fonte: Modificado da versão original publicado por Rothman, A. L.. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Reviews Immunology*, v.11, p.532-543, 2011.

Frente à infecção, o organismo hospedeiro deve ser capaz de estabelecer uma resposta inflamatória para a eliminação do patógeno,

eliminando assim o risco de desenvolver uma doença (Costa et al., submitted). Nesta resposta do hospedeiro, há a ativação de inúmeras vias de sinalização, que vão desde o reconhecimento do patógeno através dos Receptores de Reconhecimento do Padrão (PRR) até a ativação de vias e de células do sistema imune e liberação de diversos mediadores inflamatórios. A ativação celular vai levar a indução de cascatas de transdução de sinais que levam a diversos efeitos, como por exemplo a desgranulação de células citotóxicas (KOYASU, 2003). A inflamação é um complexo de respostas biológicas coordenadas desencadeado por patógenos ou danos celulares. Este processo permite o controle da infecção, com a cura do organismo hospedeiro, ou, se não for corretamente regulado, pode levar a morte do organismo (GHIGO *et al.*, 2010; Costa et al., submitted).

Algumas moléculas e vias de sinalização tem sido constantemente estudadas no intuito de ajudar a elucidar o mecanismo de patogênese causada pela infecção por *Dengue virus*. SOUZA *et al.*, 2009 demonstraram a importância do Receptor do Fator de Agregação Plaquetária (PAFR) durante a infecção com DENV-2, nos quais os animais deficientes para este receptor apresentam uma proteção quando comparados aos seus controles. Além disso, a mesma proteção foi vista quando tratou-se animais selvagens infectados com o antagonista deste receptor. Outra molécula que participa do desenvolvimento da dengue após a infecção é o Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) (ASSUNCAO-MIRANDA *et al.*, 2010). A deficiência em MIF acarretou em diminuição da gravidade da doença, com uma redução na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e uma menor carga viral presente no soro e no baço dos animais deficientes, quando comparados aos seus controles.

Outros estudos desenvolvidos pelo nosso grupo têm demonstrado o papel essencial de Interferon- γ (IFN- γ) na resistência do hospedeiro murino a infecção pelo DENV, assim como a participação de Óxido Nítrico (NO) no controle da replicação viral (FAGUNDES *et al.*, 2011a; COSTA *et al.*, 2012). CHEN *et al.*, 2006 demonstraram que a produção de CXCL-10 também é importante na montagem de uma resposta inflamatória mais eficaz, visto que esta quimiocina parece competir com a partícula viral pela ligação ao receptor Heparan Sulfato.

Outro trabalho do nosso grupo demonstra também que receptores de quimiocina como CCR2 e CCR4, que pertencem ao grupo dos receptores acoplados à proteína G com 7 domínios transmembrana, apresentam uma participação indireta no decorrer da infecção, uma vez que a deficiência nestes receptores acarreta em uma pequena diminuição nos sinais clínicos, mas não interfere na carga viral (GUABIRABA *et al.*, 2010). Uma via que também pode ser ativada por este grupo de receptores e desempenha um papel importante em diversos eventos fisiológicos e inflamatórios no organismo é a via das Fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K). Essa via é capaz de ativar moléculas Fosfatidilinositois, que são importantes mensageiros secundários na sinalização intracelular (KOYASU, 2003). Nos últimos 10 anos, a inibição genética ou farmacológica da PI3K tem fornecido inúmeras evidências do envolvimento destas enzimas em reações inflamatórias e esta constante elucidação faz com que sejam alvos de diversos estudos, inclusive no intuito de ser um possível alvo terapêutico (GHIGO *et al.*, 2010).

Muitos trabalhos tem demonstrado a participação de PI3K no ambiente infeccioso, como no caso de uma infecção por *Listeria monocytogenes*, na qual estas enzimas regulam a produção de IL-12 por células do sistema imune, ou como em uma infecção por *Escherichia coli*, onde a inibição de PI3K em macrófagos bloqueia a fagocitose (CELLI *et al.*, 2001; MANSELL *et al.*, 2001; KOYASU, 2003). Há ainda relatos da participação efetiva de PI3K em infecções virais, através da inibição da apoptose (COORAY, 2004).

Segundo GHIGO *et al.*, 2010, a importância de PI3K no processo de quimiotaxia foi elucidado através da inibição da atividade dessas enzimas. O recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção é um processo dividido em diversas etapas, com PI3K desempenhando um papel fundamental em passagens específicas, tais como a captura e adesão celular.

Fosfatidilinositol 3 quinases

As PI3Ks constituem uma família de enzimas que catalisam a fosforilação do grupamento inositol da molécula lipídica fosfatidilinositol, levando a produção de fosfatidilinositol(3)-fosfato, fosfatidilinositol(3,4)-bifosfato (PtdIns (3,4) P2) e fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PtdIns (3,4,5) P3) no

interior da membrana plasmática (VANHAESEBROECK & WATERFIELD, 1999; VANHAESEBROECK *et al.*, 2001; GHIGO *et al.*, 2010; VANHAESEBROECK *et al.*, 2012). Fosfatidilinositol(3)-fosfato está constitutivamente presente em células eucarióticas e seus níveis não são alterados após a estimulação celular. Diferentemente, fosfatidilinositol (3,4)-bifosfato e fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato estão em níveis basais em células em repouso e têm sua concentração intracelular aumentada após a estimulação de uma variedade de receptores, podendo funcionar como segundos mensageiros em vias de transdução de sinal (VANHAESEBROECK *et al.*, 2001, VANHAESEBROECK *et al.*, 2012).

As PI3K são divididas em três classes, de acordo com a sua estrutura, regulação e o seu substrato específico (WARD & FINAN, 2003; VANHAESEBROECK *et al.*, 2012). A classe I é composta por heterodímeros de aproximadamente 110 kilodaltons de subunidade catalítica, conhecida como p110, e uma subunidade regulatória (VANHAESEBROECK *et al.*, 2001). Esta classe, por sua vez, pode ser subdividida em duas sub-classes: classe IA e classe IB. Na primeira, as moléculas de PI3K são ativadas principalmente por receptores envolvidos na via de sinalização de tirosina quinases e são constituídas pela subunidade catalítica p110, com diferentes isoformas (α , β ou δ) e uma subunidade reguladora (p85 α ou β ou p55 γ) (KOYASU, 2003). A classe IB, representada por PI3K γ , é composta unicamente pela subunidade catalítica p110 γ e a regulatória p101 (Figura 5). Nesta classe, as moléculas são ativadas principalmente por receptores acoplados à proteína G com 7 domínios transmembrana, através da regulação da subunidade $\beta\gamma$ desta proteína (VANHAESEBROECK *et al.*, 2001; WARD & FINAN, 2003; CAMPS *et al.*, 2005). A subunidade p110 γ , juntamente com a p110 δ , desempenham um papel central na inflamação e quimiotaxia, de modo que o bloqueio dessas pode controlar uma resposta inflamatória (WILLIAMS *et al.*, 2006; GHIGO *et al.*, 2010; MARTELLI *et al.*, 2010; VANHAESEBROECK *et al.*, 2012). Estudos indicam que a classe IB está presente apenas em mamíferos, com uma distribuição tecidual restrita, sendo mais abundante em leucócitos (VANHAESEBROECK *et al.*, 2001; KOYASU, 2003; VANHAESEBROECK *et al.*, 2012).

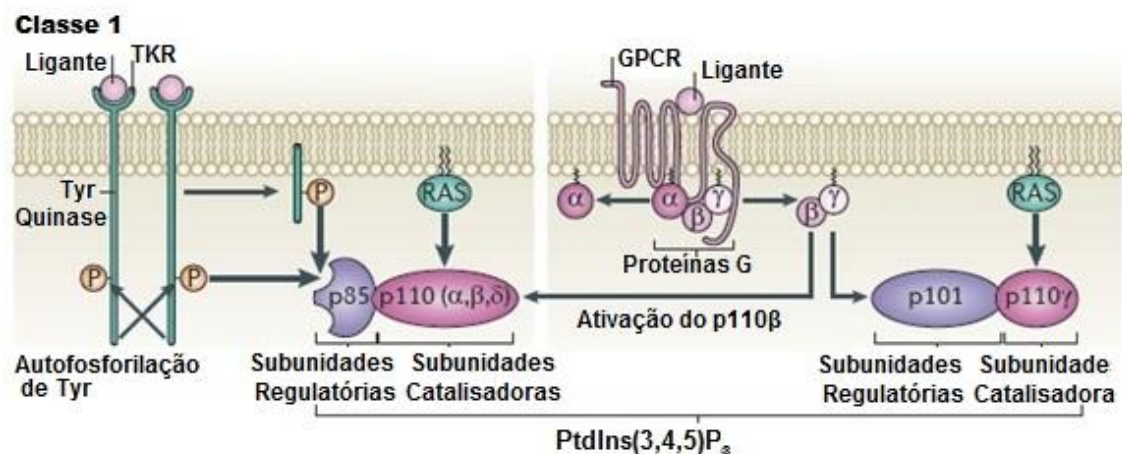


Figura 5: Representação esquemática das classes IA e IB da via da PI3K. A classe I é composta por uma subunidade catalítica de 110 Kilodaltons com variação em seus ligantes. Na classe IA, essa via é ativada através da fosforilação do receptores Tiroxina quinases, com a participação de 3 possíveis subunidades catalíticas (p110 α , β ou δ), e a subunidade regulatória p85, com 5 possíveis isoformas. Já na classe IB, a ativação da PI3K ocorre através da ligação com a subunidade $\beta\gamma$, liberada pela proteína G com 7 domínios transmembrana, no momento em que há a presença de um ligante. Essa subunidade da proteína G interage com p110 γ através da subunidade regulatória p101.

Fonte: Modificado da versão original publicado por VANHAESEBROECK, B.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 13, n. 3, p. 195-203, Mar 2012.

Há ainda as classes II e III, que estão relacionadas com o tráfego de vesículas, e, como tal, há um potencial para o seu envolvimento em atividades como processamento de antígenos e reações citotóxicas, mas ainda possuem um papel pouco elucidado na literatura (OKKENHAUG & VANHAESEBROECK, 2003). Segundo KOYASU, 2003, alguns trabalhos defendem a localização da classe II no núcleo celular, outros, porém acreditam que esta classe localiza-se no complexo de Golgi. Essa classe não tem subunidade regulatória e teria papel importante no tráfego de membrana e na internalização do receptor. A classe III estaria envolvida no movimento de proteínas através do lisossomo e na indução da autofagia (KONG & YAMORI, 2010).

A ativação da classe I da PI3K leva à produção de PtdIns (3,4,5) P₃, que atua como um sítio de ligação para várias enzimas intracelulares. Várias moléculas de sinalização são reguladas pela ativação de PI3K. Dentre elas, estão às proteínas efetoras que contêm domínio homólogo a pleckstrin

("pleckstrin homology domains"- domínio PH) (KOYASU, 2003; VANHAESEBROECK *et al.*, 2012). De acordo com WERNER *et al.*, 2010, a vinculação do domínio PH- PtdIns (3,4,5) P3 é o mecanismo molecular que medeia o recrutamento de membrana e a ativação posterior de proteínas essenciais de sinalização. Talvez a mais importante delas seja a proteína quinase B (AKT/PKB), que tem um papel importante no crescimento, proliferação, sobrevivência e metabolismo celular e cujo papel é conservado através da evolução (OKKENHAUG & VANHAESEBROECK, 2003; MARONE *et al.*, 2008) (Figura 6). Segundo COUGHLIN *et al.*, 2010, as proteínas AKT e quinase dependente de fosfatidilinositol- 1 (PDK-1) são recrutadas para a membrana e ativadas pela ligação direta ao PtdIns (3,4,5) P3 acumulado na membrana. A AKT/PKB é fosforilada por poder afetar a apoptose através da regulação do ciclo celular e é o mediador principal da sinalização da PI3K (WERNER *et al.*, 2010) e portanto, seria a mediadora da sobrevivência. Um importante mecanismo potencial que AKT/PKB utiliza para regular a apoptose é o controle transcricional de genes anti-apoptóticos. Estes incluem vários fatores de transcrição, dentre eles o NF- κ B (VANHAESEBROECK *et al.*, 2001; VANHAESEBROECK *et al.*, 2012). Essas moléculas são importantes na regulação de várias respostas celulares fisiológicas e fisiopatológicas incluindo: proliferação e sobrevivência celular, adesão e migração de células como leucócitos e eosinófilos tanto *in vitro* como *in vivo* (SASAKI *et al.*, 2000; PINHO *et al.*, 2005; PINHO *et al.*, 2007).

Neste contexto, por exemplo, foi demonstrado por SASAKI *et al.*, 2000, que camundongos deficientes na subunidade catalítica p110 da PI3K γ apresentaram um defeito na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e que a diminuição na quimiotaxia de neutrófilos em animais deficientes para PI3K γ ocorre devido a deficiência na motilidade dessas células e não no processo de adesão. Em outro estudo, macrófagos de camundongos deficientes em PI3K γ apresentaram migração reduzida frente a uma variedade de estímulos quimiotáticos e após a indução de peritonite séptica por bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (HIRSCH *et al.*, 2000). Já PINHO *et al.*, 2007 demonstraram que o envolvimento de PI3K γ no recrutamento dos neutrófilos depende do estímulo quimiotático e do tecido em que a estimulação inflamatória está ocorrendo.

No contexto de infecções virais, é evidente o papel da via da PI3K e de AKT por alguns vírus como um mecanismo de inibição da apoptose durante uma infecção aguda (COORAY, 2004). Este mesmo trabalho relata a participação de PI3K em infecções estabelecidas por diferentes vírus como, por exemplo, *Hepatitis C virus* (HCV), que utiliza da sua proteína NS5 para interagir com PI3K e AKT e contribuir assim para a sobrevivência celular. Ainda, dois outros trabalhos *in vitro* demonstraram a importância da ativação da via da PI3K em infecções, incluindo o DENV-2, e por outros *Flavivirus*. O primeiro demonstrou a notável ocorrência da fosforilação da AKT após a infecção tanto pelo *Vírus da Encefalite Japonesa* (VEJ) quanto pelo DENV-2 em células neuronais N18 de camundongos. Além disso, os autores demonstraram que após o bloqueio da ativação desta via, através do uso de um inibidor para a mesma (LY294002 ou Wortmannin), houve um aumento importante nos efeitos citopáticos induzidos pelos vírus mesmo em fases iniciais da infecção, entretanto não houve diferenças na multiplicação viral e na produção de partículas virais. Esse aumento nos efeitos citopáticos induzidos pelo vírus foi relacionado ao aumento da apoptose, na qual sugere-se o envolvimento de caspase 6 e 9 (LEE *et al.*, 2005). O outro trabalho, por sua vez, demonstrou que os VEJ e DENV-2 são capazes de iniciar a resposta imune inata do hospedeiro através do desencadeamento da ativação da via da PI3K. Essa ativação culminaria em indução de NF- κ B que induziria a expressão de interferon- β de maneira dependente a taxa de replicação viral e síntese proteica (CHANG *et al.*, 2006). Mais recentemente, um estudo desenvolvido por MCLEAN *et al.*, 2011, conclui que a proteína NS4A de *Flavivirus* é o único mediador capaz de induzir a proteção do vírus contra a morte celular, e essa regulação ocorre de maneira dependente de PI3K.

PI3K têm sido intrinsecamente relacionada ao funcionamento de diversas células do sistema imune como, por exemplo, neutrófilos, macrófagos, mastócitos e eosinófilos. Nas duas primeiras, PI3K γ tem sido relacionada com a produção inicial de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo que esta produção é depois mediada por PI3K δ e ainda, a ablação de PI3K γ compromete esta produção (SASAKI *et al.*, 2000, HIRSCH *et al.*, 2000; GHIGO *et al.*, 2010). Já nos mastócitos, essas isoformas de PI3K tem sido relacionadas com o processo de desgranulação (GHIGO *et al.*, 2010).

Uma enzima importante na modulação da via da PI3K é a PTEN (*Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), um gene supressor de tumor, que remove o grupo fosfato da posição D3 do anel inositol freqüentemente mutado em tumores, desfosforilando a AKT e modulando negativamente a via da PI3K. De acordo com estudos publicados, PTEN regula negativamente os níveis intracelulares de PI (3,4,5) P3, mais provavelmente através de desfosforilação direta. Essa atividade, por consequência, está relacionada com a regulação da adesão, migração celular e sobrevivência de leucócitos (VANHAESEBROECK *et al.*, 2001). O aumento do nível lipídico nessas células correlaciona com ativação de AKT/PKB, e a reintrodução de PTEN provoca a inibição da AKT/PKB e outros alvos da PI3K. Além disso, esses efeitos inibitórios podem ser revertidos por superexpressão de formas ativas da AKT/PKB (VANHAESEBROECK *et al.*, 2001).

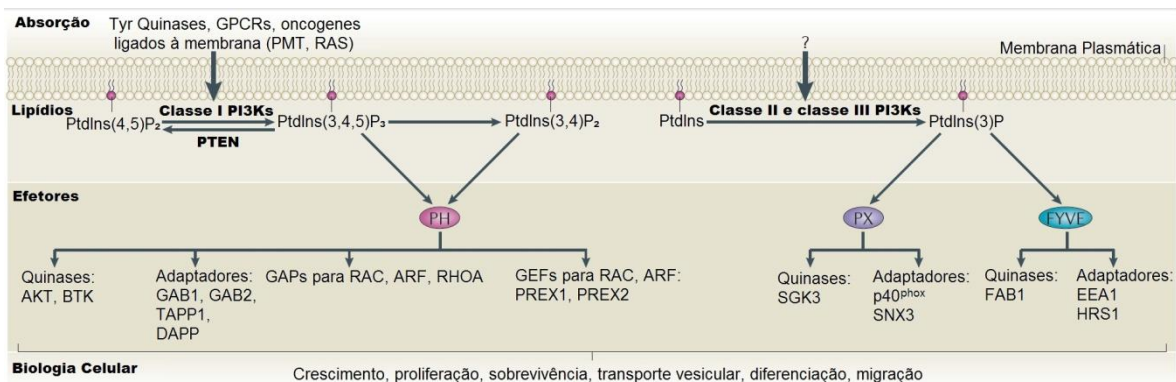


Figura 6: Representação esquemática da ativação e ação de PI3K. A via da PI3K é ativada através de receptores como Tirosina quinases, receptores acoplados à proteína G com 7 domínios transmembrana, ou moléculas como, por exemplo, oncoproteínas. As PI3K são responsáveis pela fosforilação de PtdIns (3,4) P2 para PtdIns (3,4,5) P3, sendo regulada negativamente por PTEN. A ativação de PI3K leva então a ligação com proteínas efetoras, como as que contêm domínio homólogo a pleckstrin, que serão necessárias para ativação de moléculas que desencadeiam principalmente processos fisiológicos no organismo, como AKT.

Fonte: Modificado da versão original publicado por VANHAESEBROECK, B.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 13, n. 3, p. 195-203, Mar 2012.

JUSTIFICATIVA

Devido ao grande número de casos de dengue, ao desenvolvimento de inúmeros casos graves da doença e aos óbitos causados pelo DENV, o estudo sobre a patogênese da doença no organismo humano tem-se feito necessário, dado que até o presente momento o tratamento utilizado na clínica é paliativo e ainda não há vacinas aprovadas.

Como nas demais infecções virais, diversas moléculas e vias de sinalização antivirais são ativadas no organismo do hospedeiro no intuito de estabelecer uma resposta imune que seja capaz de eliminar o patógeno. Dentre essas vias ativadas, destacamos a PI3K. Estudos recentes têm demonstrado uma relação entre *Flavivirus* e as PI3K, onde relatam que a apoptose tem sido implicada como um mecanismo que favorece os efeitos citopáticos do vírus nas células infectadas em resposta à infecção por DENV *in vitro*. Ademais, a via da PI3K γ tem sido muito relacionada com o funcionamento de diversas células do sistema imune, dentre elas, PI3K γ está intrinsecamente relacionada à migração de leucócitos (VANHAESEBROECK *et al.*, 2001; GHIGO *et al.*, 2010).

Diante dessas evidências da participação de PI3K γ na ação do sistema imune, assim como o grande problema causado por DENV na saúde pública, decidimos por estudar o papel da via enzimática PI3K γ na infecção pelo sorotipo 3 do DENV em camundongos. Desta forma, buscamos compreender melhor os mecanismos da patogênese do dengue experimental e como esta via atua neste processo.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Estudar o papel da via da PI3K γ na patogênese do dengue experimental após infecção pelo sorotipo 3 do *Dengue virus* em camundongos.

Objetivos específicos

- I. Verificar se há ativação da via da PI3K γ após infecção pelo DENV-3;
- II. Verificar se há diferença entre a taxa de letalidade nos animais selvagens (WT) e deficientes para PI3K γ (PI3K γ ^{-/-}) infectados pelo DENV-3;
- III. Analisar os parâmetros hematológicos nos animais WT e PI3K γ ^{-/-} infectados pelo DENV-3;
- IV. Analisar a presença de neutrófilos nos órgãos-alvo da doença, como baço, fígado e pulmões dos animais WT e PI3K γ ^{-/-} infectados pelo DENV-3;
- V. Analisar a produção de citocinas e quimiocinas importantes na resposta inflamatória pelo DENV-3 no baço e soro dos animais WT e PI3K γ ^{-/-};
- VI. Avaliar o dano hepático nos animais WT e PI3K γ ^{-/-} infectados pelo DENV-3;
- VII. Analisar a carga viral no sangue, baço e fígado dos animais WT e PI3K γ ^{-/-} infectados pelo DENV-3;
- VIII. Verificar a presença de NS3 no fígado dos animais WT e PI3K γ ^{-/-} infectados pelo DENV-3;

MATERIAIS E MÉTODOS

Vírus

O vírus foi previamente adaptado pelo nosso grupo, como descrito em COSTA *et al.*, 2012. De forma resumida, para a adaptação, o DENV-3 foi injetado por via intracerebral (i.c.) em camundongos neonatos, sendo que no quinto dia após a infecção, os cérebros destes animais foram retirados e um homogenato dos cérebros realizado em uma solução de 10% p/v em PBS, centrifugado a 1.000 g, 4°C por 1 minuto, o sobrenadante coletado e essa solução foi injetada (i.c.) em novos animais. Após várias passagens deste procedimento, os animais foram então infectados por via intraperitoneal (i.p.), nos quais observou-se a instalação dos sinais característicos da doença em camundongos (ex: redução da exploração do ambiente, arqueamento do dorso, paralisia dos membros posteriores). Após estes experimentos, foi então realizada uma inoculação com diluição seriada em animais adultos (8 semanas de idade), na qual pode-se acompanhar a taxa de letalidade inóculo-dependente.

Titulação do vírus da Dengue

Células LLC- MK2 foram crescidas em meio DMEM com 5 a 6% de soro fetal bovino (SFB) na presença dos antibióticos: fungizona (2 ug/mL), penicilina (100 U/mL) e gentamicina (50 ug/mL). Em seguida tripsinizadas, homogeneizadas e implantadas em placa de seis poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C por cerca de 24 horas, quando então seus poços apresentaram uma monocamada de células com uma confluência de 70% a 80%. As amostras de baço e fígado foram pesadas, maceradas com “cadinho” e pistilo de porcelana estéreis e diluídas serialmente em meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB. As amostras de sangue foram diluídas em solução salina Fosfato-tamponada (PBS) e diluídas serialmente em DMEM. A cada poço foi adicionado 400 μ L de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-7}) de uma dada amostra. O controle de células correspondeu a uma placa, na qual foi utilizado um poço não-inoculado, sendo acrescentado apenas o meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB. As placas foram incubadas por um período de uma hora e meia a 37°C

(período de adsorção) durante o qual foram gentilmente movimentadas de quinze em quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Terminado o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato (“phosphate-buffered saline – PBS”) (0.4 M NaCl e 10 mM de NaPO₄). Em seguida, foi adicionado meio 199 contendo 1.5% de carboximetilcelulose, antibióticos e 3% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C por 7 dias ou até que aparecessem os efeitos citopáticos observados ao microscópio invertido. As mesmas foram fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em PBS para a determinação do título das amostras, os quais foram expressos em PFU/mL (unidades formadoras de placas por mililitro).

Animais e protocolo experimental

Nesse trabalho, foram utilizados animais da linhagem C57BL/6j (WT), provenientes do centro de bioterismo do UFMG e animais deficientes para PI3K γ (PI3K γ ^{-/-}), criados e mantidos no nosso biotério. Os animais utilizados estavam com 8 semanas de idade, com n de 7 a 11 animais por grupo. Foram infectados por via intraperitoneal (i.p) com 100 PFU/100 μ L do DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino, correspondente a 1LD₅₀, conforme descrito em COSTA *et al.*, 2012. Para controle dos experimentos foram utilizados grupos de animais WT ou PI3K γ ^{-/-} inoculados com homogenato de cérebros de animais neonatos previamente diluídos em PBS. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal da UFMG/CETEA – PROTOCOLO N°113/09. Os animais foram monitorados em intervalo de 16 dias para a obtenção das curvas de letalidade ou então, sacrificados no 7^o dia após a infecção para a análise dos parâmetros inflamatórios.

Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes

No momento do sacrifício, 10 µL do sangue de animais NI e infectados em ambos os dias, foi coletado através veia cava inferior, e colocado em tubos heparinizados. Este volume foi diluído na proporção de 1:100 em solução de oxalato de amônio 1%, o volume incubado por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, 10 µL foram colocados na câmara de Neubauer Bright-Line (Loptick Labor). Após nova incubação de 15 minutos, o número de plaquetas foi quantificado no microscópio óptico invertido (LABOMED[®] TCM 400) utilizando a objetiva de 40X.

Análise do índice de hematócrito

Uma pequena amostra de sangue de cada animal foi coletada por meio de um tubo capilar de vidro heparinado para determinação de micro-hematócrito (Perfecta), o qual foi centrifugado em uma centrífuga de micro-hematócrito, rotação por 10 minutos (Centrifuge hematocrit HT). Em seguida, foi realizada uma proporção entre o comprimento das porções vermelha (concentração de elementos do sangue) e branca (concentração de plasma), através de uma regra de três simples:

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

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

Determinação dos níveis de citocinas

Para dosagem de citocinas, fragmentos do baço foram homogeneizados em PBS contendo inibidor de proteases (0,1 mM “*phenylmethiylsulfonyl fluoride*”, 0,1 mM “*benzethonium chloride*”, 10 mM “EDTA” e 20 KI aprotinina A) e 0,05% “*Tween 20*”, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher

Scientific Pennsylvania, USA). O sobrenadante foi usado para as dosagens, após centrifugação de 3.000 g durante 10 minutos à 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). As amostras de baço foram analisadas na diluição 1:3 como previamente padronizadas em nosso laboratório.

A concentração das citocinas IL-6, IFN- γ e TNF- α e da quimiocina CXCL-1 foram quantificadas no baço e no soro dos animais através da técnica de ELISA *sandwich*, de acordo com descrição feita por SOUZA *et al.*, 2000a; SOUZA *et al.*, 2000b, utilizando-se kits de anticorpos adquiridos do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo recomendado, resumidamente descrito abaixo.

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

Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi obtida pelos ensaios de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) como descrito anteriormente por Matos *et al* (1999). Sumariamente, fragmentos de tecido dos animais tanto infectados como controles foram removidos e congelados a -20°C. Após o descongelamento, 100 mg de tecido foi homogeneizado em 1.9 mL de tampão (pH 4,7) (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA), e centrifugado a 3.000 g por 10 minutos

(Centrífuga. BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). O precipitado foi submetido à lise hipotônica (1.5 mL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 s após).

Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em 1.9 mL de tampão NaPO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de "hexadecyltrimethylammonium (HTAB)" 0,5% e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, Eppendorf do Brasil, São Paulo, SP Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento, utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.000g e os sobrenadantes coletados. As amostras dos tecidos foram diluídas previamente à análise em tampão NaPO_4 0,05 M na razão 1:10.

A atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuscitado foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H_2O_2 (0,5 mM). A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos acompanhado da OD do sobrenadante do tecido e comparados com neutrófilos da cavidade peritoneal igualmente processados. Para tanto, a indução de neutrófilos na cavidade peritoneal foi realizada pela injeção de 3 mL de caseína 5%. Uma curva padrão do número de neutrófilos versus OD foi obtida previamente pelo processamento de neutrófilos purificados (> 95% pureza) como descrito acima e utilizado para a medida de atividade da mieloperoxidase.

Avaliação dos níveis das Transaminases Hepáticas no soro

O sangue de animais foi coletado no 7º dia após infecção através da veia cava inferior, colocado em tubos heparinizados, centrifugados 5.000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro. A dosagem das transaminases TGO e TGP foi realizada através de teste colorimétrico utilizando Kits específicos para cada uma, sendo a transaminase TGO/AST dosada pelo Kit K034 e transaminase TGP/ALT pelo Kit K035, ambos da Bioclin/Quibasa. A leitura foi feita em leitor de ELISA no comprimento de onda de 505 nm.

Análises Histopatológicas

Amostras do fígado dos animais foram coletadas no 7º dia após a infecção e foram imersos em formol tamponado a 10% em PBS por 24 horas e em seguida, colocados em solução de álcool 70% até o processamento das amostras. Para o processamento, os tecidos foram submetidos a subsequentes passagens em etanol em diferentes concentrações (80%, 90%, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada), xilol (1 e 2 – 20 minutos cada) e em parafina líquida (Paraplast Sigma; 1 e 2 – 30 minutos). Esses tecidos foram incluídos em blocos de parafina. Cortes de 5 micrômetros (μm) de espessura foram dispostos em lâminas de microscopia. Após essa fase, foram desparafinizados (xilol 20 minutos; álcool absoluto, 90%, 80% e 70% - 5 imersões; água). As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de Hematoxilina de Harris (20 segundos) e Eosina (8 segundos) (HE). Em seguida, houve a desidratação (álcool 70, 80, 90% e absoluto 1 e 2 – 5 imersões; xilol 1 e 2 – 5 imersões) e montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá sintético. Após este processo, as lâminas foram avaliadas sob um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha), adaptado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Japão). A pontuação histopatológica foi realizada de acordo com um conjunto de critérios personalizados conforme descrito em COSTA *et al.*, 2012. Resumidamente, avaliou-se o edema de hepatócitos, degeneração, necrose e hemorragia, com o uso de uma escala de 0 a 5 pontos (0, ausente; 1, mínimo; 2, leve; 3, moderado; 4, marcante e 5, grave) em cada análise. Para facilitar a interpretação, a pontuação geral avaliou todos os parâmetros acima, totalizando 20 pontos.

Imunohistoquímica

Para realização da imunohistoquímica, as amostras de fígado utilizadas para a análise histopatológica foram cortadas com 5 micrômetros (μm) de espessura e foram dispostas em lâminas de microscopia. Após, foram desparafinizadas e hidratadas, seguida de incubação com tampão citrato por 30 minutos a 94°C. Incubou-se com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diluído em solução salina Tris-tamponada (TBS) por 30 minutos, seguida de lavagem com

TBS por 15 minutos. Para detecção da proteína viral NS3, utilizou-se anticorpo anti-DENV NS3 Malb E1D8 diluído em PBS+BSA a 1%, numa diluição de 1:350, e incubado em câmara úmida a 4°C por 18 horas. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas em TBS por 15 minutos e tratado com streptoavidina marcada com biotina-kit + EnVisionH Dual Link System-HRP (Dako). As secções foram então lavadas em PBS com tetrahidrocloreto 3,39 diaminobenzidina-(K3468, Dako) por 5 minutos e corados com hematoxilina de Mayer para a quantificação de células NS3⁺. A contagem das células foi realizada em microscópico de alta potência, sendo 10 campos alternados para cada amostra. Áreas de necrose e hemorragia foram excluídas da análise.

Western Blot

Amostras do baço foram retirada dos animais no 3^o, 5^o e 7^o dia após infecção e foram preparadas como descritas por DIGNAM *et al.*, 1983; SOUSA *et al.*, 2009. Resumidamente, a separação do material citoplasmático do nuclear foi feita através da adição de 500 µL de tampão RSB 1X (100mM Tris pH 7.4, 100mM NaCl, 30mM MgCl₂, 0.02% NaN₃), seguida pela maceração do tecido com homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA), e gelo por aproximadamente 15 min. Após, foi adicionado a mistura, 150 µL de uma solução de Nonidet P-40 a 5%., invertida gentilmente por 3 vezes e deixada no gelo por mais 5 min. Seguiu-se com a centrifugação da mistura a 6000 rpm por 6 min a 4°C. O sobrenadante corresponde ao extrato citoplasmático e foi aliquoteado. O sedimento foi lavado com RSB 1X e centrifugado a 900 rpm por 6 min a 4°C. O restante do sobrenadante foi totalmente removido e ressuspendeu-se o sedimento em 200 µL do tampão C (0.42M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 25% (v/v) de Glicerol, 20 mM HEPES pH7.4, 0.2mM EDTA, 0.01% NaN₃). Após ficar no gelo por aproximadamente 30 a 40 min, a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e corresponde ao extrato nuclear. A quantidade de proteínas foi dosada com reagentes de ensaio *Bradford* (Bio-Rad). Extratos (40µg) foram separados por eletroforese numa desnaturação de 10/15% de gel SDS de poliácridamida e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas em 4°C *overnight* com PBS a

5% (p/ v) de leite em pó desnatado e 0,1% Tween-20, lavadas três vezes com PBS contendo 0,1% Tween-20 e então incubados com anticorpos específicos P-Akt^{ser473} – Cell Signalling Technology; NF-κB – Santa Cruz Biotechnology) (1:1000) em solução salina contendo 5% (p / v) BSA e 0,1% Tween-20. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:3000). Bandas imunorreativas foram visualizadas usando sistema de detecção ECL, como descrito pela fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Para realização da densitometria, foi utilizado o programa *Image J* analysis software (NIH).

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão médio (EPM). As percentagens de inibição foram calculadas através da subtração dos níveis de basais (obtidos em animais não-infectados) em relação aos animais selvagens e deficientes para PI3K γ . As diferenças entre as médias foram analisadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls. Quando necessário foi utilizado o teste t de student. Diferenças entre as curvas de sobrevivência foram calculadas usando o teste *Log rank*. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA). Resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica e a obtenção de artigos em formato eletrônico foram feitas através da base de dados do portal Medline/Pubmed, no endereço: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>>. A obtenção de artigos em formato eletrônico também foi feita através da base de dados do portal Periódicos Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes/Mec), no endereço: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/portugues/index.jsp>>. Foram avaliados artigos originais, de revisão ou atualização e capítulos de livros-texto, conforme sua relevância para o tema de estudo, escritos em português e inglês. As

palavras-chaves utilizadas foram: “*Phosphoinositide 3-kinase, NF-κB, AKT, Dengue virus, infection, inflammation, systemic inflammatory response*”.

RESULTADOS

I. Infecção por DENV-3 ativa a via da PI3K.

Inicialmente, realizamos um experimento para avaliar se a via da PI3K é ativada durante a infecção por DENV-3. A Figura 7 demonstra que após a infecção pelo DENV-3, há a ativação dessa via demonstrada pela ativação de proteínas associadas a cascata de ativação de PI3K, como as moléculas AKT/PKB e NF- κ B.

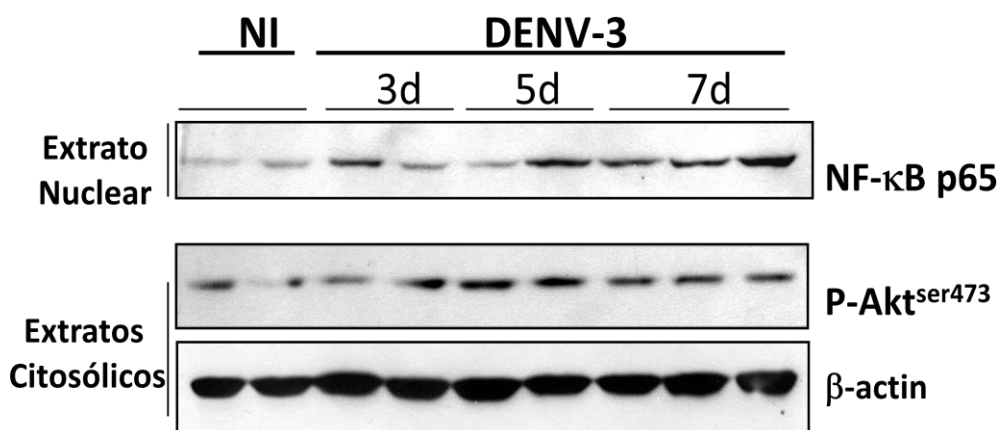


Figura 7: Ativação da via da PI3K γ após infecção pelo DENV-3. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 100 PFU/100 μ L do DENV-3 previamente adaptado ao hospedeiro murino, como descrito em COSTA *et al.*, 2012. A fosforilação da via foi avaliada através de Western Blot do baço dos animais previamente infectados. A figura é representativa de 2-3 animais. Esse dado é representativo de 2 experimentos.

II. Animais deficientes em PI3K γ apresentam taxa de letalidade reduzida após a infecção com o DENV-3 em relação aos seus controles selvagens.

Para avaliar o papel da via enzimática PI3K γ na patogênese da infecção por DENV-3, animais deficientes na expressão da molécula PI3K γ e seus respectivos controles selvagens foram infectados com 100 PFU/100 μ L do DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino e monitorados quanto à taxa de sobrevivência por um período de 16 dias (Figura 8).

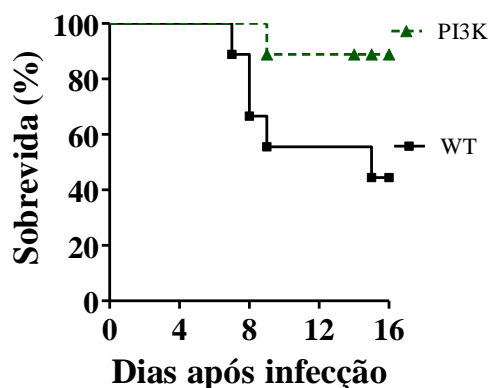


Figura 8: Taxa de letalidade induzida pela infecção pelo sorotipo 3 do Dengue virus em camundongos PI3K^{-/-} e WT. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 100 PFU/100µL do DENV-3 previamente adaptado ao hospedeiro murino, como descrito em COSTA *et al.*, 2012. A sobrevivência dos animais infectados foi avaliada no decorrer de 16 dias. Os grupos foram de 7 animais cada.

Pode-se observar que os animais PI3K^{-/-} apresentaram maior sobrevivência em relação aos animais WT infectados com o mesmo inóculo viral. Na figura 8 observa-se que enquanto cerca de 60% dos animais WT sucumbiram à infecção até o dia 16, esse percentual foi aproximadamente 3 vezes menor nos animais PI3K^{-/-}, correspondendo a, aproximadamente, 15%.

III. Animais PI3K^{-/-} apresentam menores alterações hematológicas após infecção com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino quando comparados aos animais WT.

A plaquetopenia e hemoconcentração são fenômenos que ocorrem durante o ciclo de infecção por *Dengue virus* em humanos (GUZMAN *et al.*, 2010). No modelo desenvolvido pelo nosso grupo, temos estas alterações de parâmetros hematológicos evidenciados (SOUZA *et al.*, 2000a; COSTA *et al.*, 2012). A Figura 9 demonstra a avaliação desses parâmetros nos animais selvagens e deficientes para PI3K γ após a infecção pelo DENV-3.

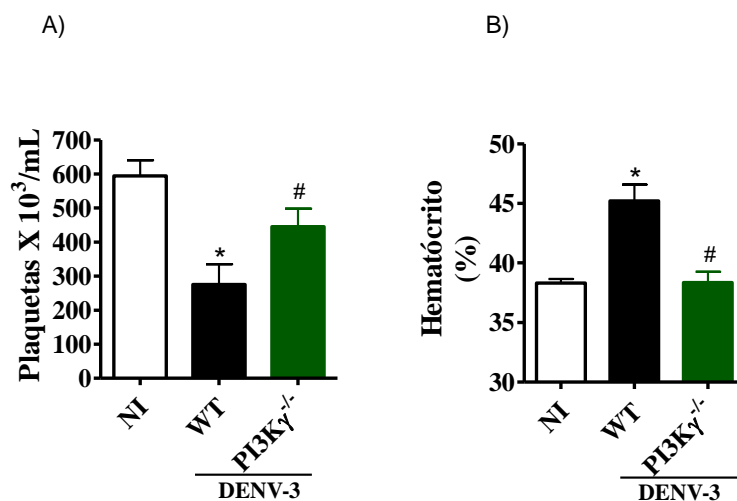


Figura 9: Análise dos parâmetros hematológicos induzida pela infecção pelo DENV-3 em camundongos PI3K γ ^{-/-} e selvagens (WT). Os animais foram infectados intraperitonealmente com 100 PFU/100 μ L do DENV-3 previamente adaptado ao hospedeiro murino, como descrito em COSTA *et al.*, 2012, anestesiados e eutanasiados para a coleta do sangue no 7^o dia após infecção. Os resultados de plaquetas são expressos em número de plaquetas/mL e o de hematócrito foram expressos em porcentagem. Média \pm EPM de 5-7 animais por grupo. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais NI, # para $p < 0,05$ quando comparados os animais WT e PI3K γ ^{-/-}.

Como ilustrado pela figura 9, os animais selvagens apresentaram uma trombocitopenia acentuada, com uma porcentagem de hematócrito elevada, uma indicação indireta de um intenso extravasamento plasmático. Os animais PI3K γ ^{-/-} não apresentaram alterações hematológicas significativas, características da doença. Esses animais tiveram um índice de número de plaquetas similar aos animais não infectados (Figura 9A) e também não apresentaram alterações na porcentagem de hematócrito, o que corresponde ao inverso do ocorrido com os animais WT (Figura 9B).

IV. Animais PI3K γ ^{-/-} apresentam menor infiltrado neutrofílico após infecção com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino quando comparados aos animais WT.

Durante a patogênese do *Dengue virus*, ocorre a ativação de neutrófilos, os quais podem acumular nos tecidos, contribuindo para aumentar a lesão gerada durante a infecção (RENNESON *et al.*, 2011). Diante disso, a Figura 10

ilustra o infiltrado neutrofílico presente no baço (Figura 10A), fígado (Figura 10B) e pulmões (Figura 10C) dos animais infectados com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino. Como pode-se observar, os animais WT apresentaram intensos níveis de atividade da enzima mieloperoxidase, enquanto os animais $PI3K\gamma^{-/-}$ apresentam menores níveis da atividade da enzima mieloperoxidase, que é um indicativo indireto da presença de neutrófilos nos órgãos analisados. Com isso, conclui-se que os animais selvagens possuem um infiltrado neutrofílico significativo nestes órgãos, o que nos animais deficientes para $PI3K\gamma$ apresenta-se em um número menor.

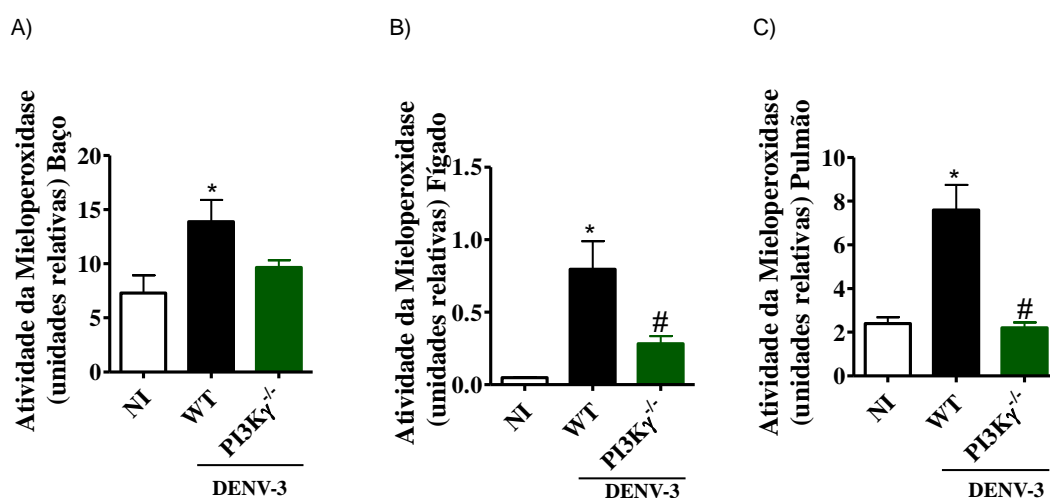


Figura 10: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase no baço, fígado e pulmões dos camundongos $PI3K\gamma^{-/-}$ e selvagens (WT) infectados com DENV-3. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 100 PFU/100 μ L do DENV-3 previamente adaptado ao hospedeiro murino, como descrito em COSTA *et al.*, 2012, anestesiados e eutanasiados para a coleta dos órgãos no 7^o dia após infecção. Os resultados são expressos em unidades relativas. Média \pm EPM de 5-7 animais por grupo. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais NI, # para $p < 0,05$ quando comparados os animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$.

V. Animais $PI3K\gamma^{-/-}$ apresentam menor produção de citocinas e quimiocina após infecção com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino quando comparados aos animais WT.

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α , IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 foram quantificados no baço e soro dos animais infectados com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino.

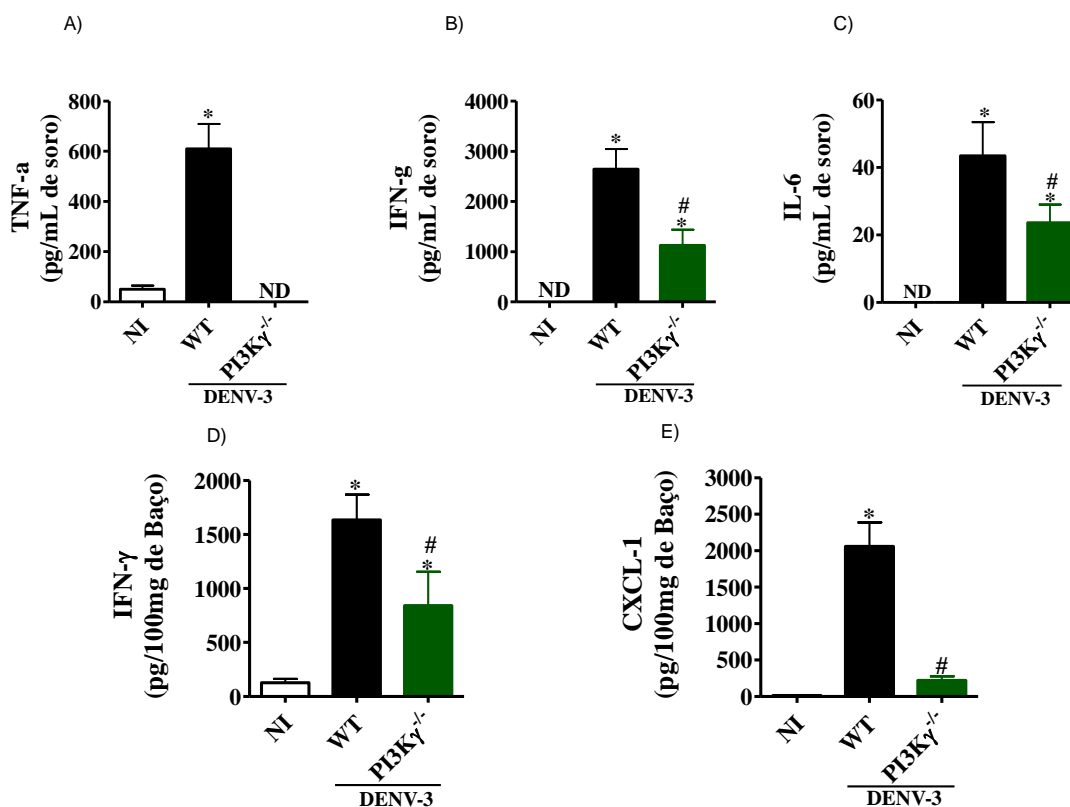


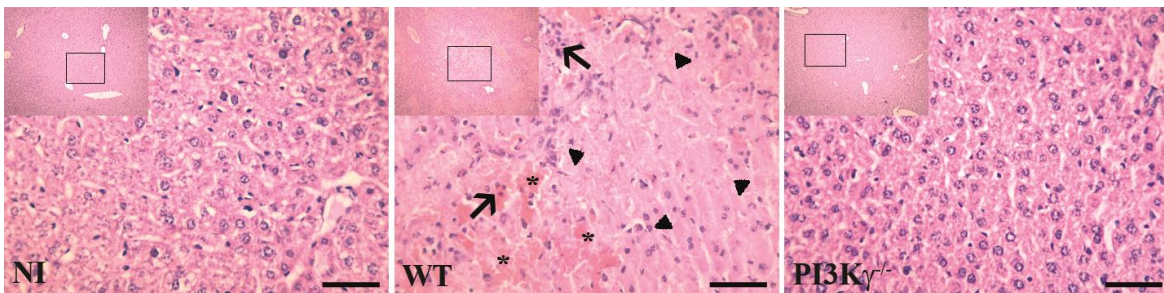
Figura 11: Quantificação da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α , IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no baço e no soro dos camundongos PI3K γ ^{-/-} e WT infectados com DENV-3. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 100 PFU/100 μ L do DENV-3 previamente adaptado ao hospedeiro murino, como descrito em COSTA *et al.*, 2012, anestesiados e eutanasiados para a coleta do baço e sangue para obtenção do soro no 7^o dia após infecção. Média \pm EPM de 5-7 animais por grupo. * para p < 0,05 quando comparados com os animais NI, # para p < 0,05 quando comparados os grupos de animais infectados WT e PI3K γ ^{-/-}.

Observa-se uma produção elevada de citocinas IL-6, TNF- α , IFN- γ no soro (Figura 11A, 11B e 11C) e de IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no baço (Figura 11D e 11E) dos animais selvagens infectados. Essa elevação pode ser relacionada a um processo inflamatório mais significativo, uma vez que detecta-se uma redução na detecção das citocinas e quimiocina acima apresentadas nos animais PI3K γ ^{-/-}, quando comparado aos animais selvagens. Vale ressaltar que não foi detectada diferença significativa quando avaliado CXCL-1 no soro, assim como quando avaliado TNF- α e IL-6 no baço dos animais infectados.

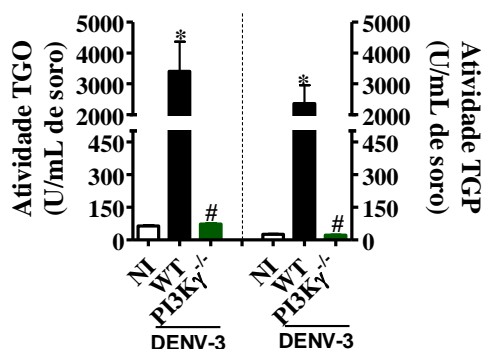
VI. Animais PI3K γ ^{-/-} apresentam menor dano hepático após infecção com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino quando comparados aos animais WT.

O dano hepático é uma das características marcantes do desenvolvimento da doença (GUZMAN *et al.*, 2010; SIMMONS *et al.*, 2012). Neste contexto, avaliamos a presença do dano hepático através de análises histopatológicas e dosagem dos níveis de transaminases hepáticas, uma vez que achados laboratoriais demonstram uma alteração nos níveis destas transaminases em pacientes infectados com *Dengue virus*, corroborando com a presença de dano hepático (SIMMONS *et al.*, 2012), além de uma análise de graduação do dano para a quantificação deste, através de uma pontuação pré-estabelecida (Figura 12).

A)



B)



C)

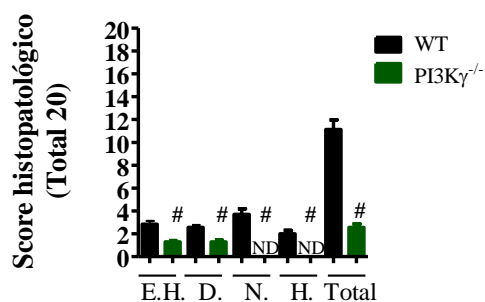


Figura 12: Análise dos danos hepáticos induzidos pela infecção pelo DENV-3 em camundongos PI3K γ ^{-/-} e selvagens (WT). Os animais foram infectados intraperitonealmente com 100 PFU/100 μ L do DENV-3 previamente adaptado ao hospedeiro murino, como descrito em COSTA *et al.*, 2012, anestesiados e eutanasiados para a coleta do fígado no 7^o dia após infecção. Em A, * representam áreas de hemorragia, os triângulos representam áreas de

necrose, as setas indicam a presença de infiltrados de células inflamatórias. E.H.: edema de hepatócitos, D: degeneração, N: necrose, H: hemorragia. Barra de escala: 100 μ m. Em B e C, * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais NI, # para $p < 0,05$ quando comparados os animais WT e $PI3K\gamma^{-/-}$. Média \pm EPM de 5-7 animais por grupo.

Observa-se que os animais WT apresentam um dano hepático significativo (Figura 12A), com áreas de lesão tecidual, necrose, hemorragia e um grande número de células inflamatórias infiltradas, relatando a presença de uma inflamação intensa neste órgão. Já os deficientes para $PI3K\gamma$ apresentaram menor comprometimento hepático, com preservação da histologia do órgão, assim como menor detecção de atividade de transaminases TGO e TGP (Figura 12B) e menores níveis de hepatócitos com edemas, áreas de necrose, áreas de hemorragia e também de degeneração, resultando em um escore de lesão (Figura 13C) cerca de 4 vezes menor em comparação com os animais WT.

VII. Animais $PI3K\gamma^{-/-}$ apresentam menor carga viral após infecção com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino quando comparados aos animais WT.

A Figura 13 ilustra a carga viral presente no sangue, baço e fígado dos animais infectados pelo DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino.

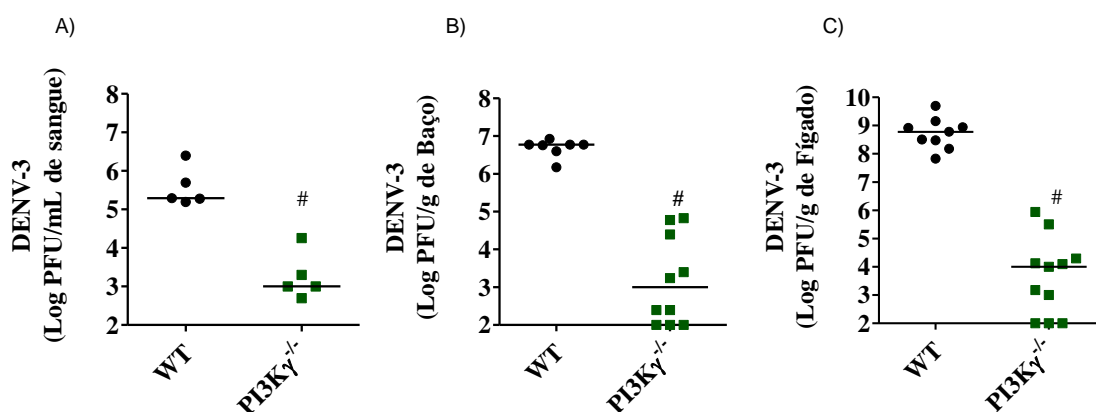


Figura 13: Verificação da carga viral no sangue, baço e fígado dos camundongos $PI3K\gamma^{-/-}$ e WT infectados com DENV-3. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 100 PFU/100 μ L do DENV-3 previamente adaptado ao hospedeiro murino, como descrito em COSTA *et al.*, 2012, anestesiados e eutanasiados para a coleta do sangue, baço e fígado no 7^o

dia após infecção. Média \pm EPM de 5-10 animais por grupo. # para $p < 0,05$ quando comparados os animais WT e PI3K γ ^{-/-}.

Nos animais selvagens infectados, detecta-se uma carga viral elevada no sangue, baço e fígado (Figuras 13A, 13B e 13C). Esta evidência nos permite inferir a presença de uma inflamação sistêmica, com DENV detectado nos órgãos-alvo da doença, além do sangue. Em contrapartida, pode-se observar uma diferença de, aproximadamente, 4 casas na escala logarítmica na carga viral presente no baço e 2 na carga viral presente no sangue (Figuras 13A e 13B, respectivamente) dos animais PI3K γ ^{-/-} infectados com DENV-3, quando comparados aos animais WT. Além disso, observa-se também uma diminuição de, aproximadamente 5 casas na escala logarítmica na carga viral presente no fígado (Figura 13C) dos animais deficientes para PI3K γ , corroborando com a preservação da histologia deste órgão, quando comparado ao animal selvagem. Este resultado demonstra que o *Dengue virus* tem uma menor taxa de multiplicação nos animais deficientes para PI3K γ , portanto esta via parece estar relacionada com o processo de replicação viral.

VIII. Animais PI3K γ ^{-/-} apresentam menos NS3 presente no fígado após infecção com DENV-3 adaptado ao hospedeiro murino quando comparados aos animais WT.

Para verificarmos a presença do vírus no fígado dos animais infectados, realizamos uma análise imunohistoquímica para detectar a presença da proteína não-estrutural NS3.

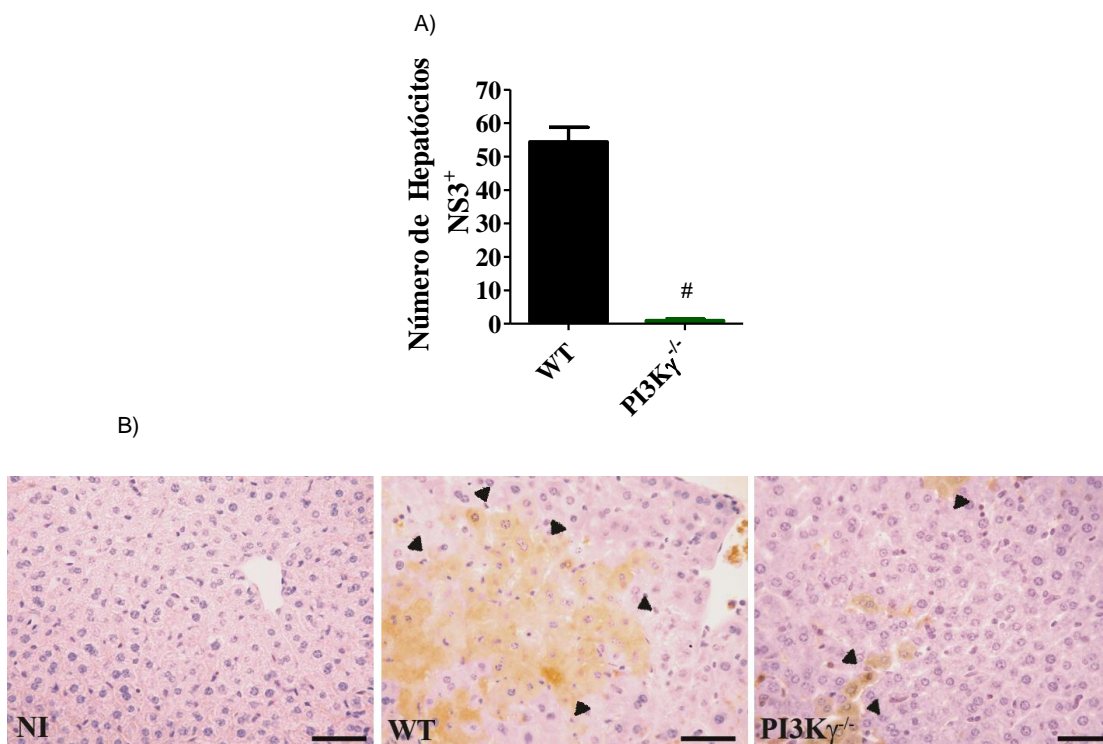


Figura 14: Verificação da presença da proteína viral não-estrutural NS3 no fígado dos camundongos PI3K γ ^{-/-} e WT infectados com DENV-3. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 100 PFU/100 μ L do DENV-3 previamente adaptado ao hospedeiro murino, como descrito em COSTA *et al.*, 2012, anestesiados e eutanasiados para a coleta do fígado no 7^o dia após infecção. Média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. Em A, # para $p < 0,05$ quando comparados os animais WT e PI3K γ ^{-/-}. Em B, as setas indicam a presença de anticorpo para NS3 corado com hematoxilina de Mayer.

Conforme demonstrado por COSTA *et al.*, 2012, durante a infecção por *Dengue virus* adaptado ao hospedeiro murino, pode-se observar a presença da proteína viral NS3 no fígado dos animais infectados, confirmando a presença do vírus neste órgão. Em concordância com a figura 13, na qual observamos uma menor detecção da carga viral no sangue, fígado e baço dos animais infectados, na Figura 14A podemos ver que a quantidade de hepatócitos marcados positivamente com a proteína estrutura NS3 (NS3⁺) é muito menor nos animais PI3K γ ^{-/-} quando comparados aos animais WT, o que está ilustrado na Figura 14B, na qual podemos observar uma quantidade significativa de coloração para marcação da proteína NS3.

DISCUSSÃO

A infecção pelos DENV tornou-se, nas últimas décadas, uma preocupação cada vez mais alarmante para a saúde pública mundial (WHITEHEAD *et al.*, 2007). Casos de epidemias, como a ocorrida no Rio de Janeiro em 2008, estão cada vez mais frequentes na história do nosso país. O pouco conhecimento acerca dos mecanismos desencadeados pela infecção, a ineficácia das medidas preventivas e terapêuticas contra a doença, bem como a ausência de uma vacina eficaz, desencadearam, nos últimos anos, um cenário preocupante na esfera mundial e ao mesmo tempo têm despertado o interesse da comunidade científica em busca de mais conhecimento acerca do vírus, do vetor e da patogênese da doença.

Em estudos recentes, constatou-se que dentre os inúmeros fatores envolvidos durante a infecção pelo DENV, a resposta imunológica exacerbada e a incapacidade de controle da replicação viral por parte do hospedeiro, são consideradas as duas maiores preocupações no que tange à infecção (NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2005; CLYDE *et al.*, 2006; HALSTEAD, 2007). Durante a busca pela homeostase, o sistema imune produz uma série de citocinas, quimiocinas e a ativação de inúmeros tipos celulares, o que pode culminar na eliminação do patógeno e reestabelecimento da homeostase no organismo, ou em danos que podem ser causados por uma resposta inflamatória descontrolada. Diversos dados da literatura demonstram a presença de altos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-10, MCP-1, e IFN- γ em pacientes infectados pelo *Dengue virus* e que essas moléculas parecem contribuir para a gravidade da doença, incluindo comprometimento hepático, hipotensão, trombocitopenia e choque hemorrágico (CHATURVEDI *et al.*, 2000; NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006). Deste modo, o estudo dos mecanismos envolvidos na resposta do hospedeiro durante a infecção pelo DENV se mostra pertinente.

O conhecimento acerca da patogênese da doença ainda é incipiente, e isto é em parte, devido a presença de poucos modelos experimentais apropriados. Nosso grupo, nos últimos anos, desenvolveu modelos animais de infecção primária para os DENV-2 e DENV-3, no qual mimetiza o quadro clínico pró-inflamatório observado durante a infecção humana. Com a utilização deste modelo, demonstramos a participação de diversas moléculas na patogênese desencadeada pelo DENV, como, por exemplo, PAF, MIF, receptores de

quimiocinas como CCR2 e CCR4, IFN- γ e NO, como descrito por SOUZA *et al.*, 2000a; ASSUNCAO-MIRANDA *et al.*, 2010; GUABIRABA *et al.*, 2010; FAGUNDES *et al.*, 2011a; COSTA *et al.*, 2012. Frente a estas evidências de que o modelo em uso permite o estudo da patogênese, este se torna uma ferramenta importante.

Como já descrito, diversos trabalhos relatam a participação da via da PI3K, especialmente a classe IB, em processos fisiológicos e, como relatado por WILLIAMS *et al.*, 2006, a PI3K γ também desempenha um papel importante na inflamação e na quimiotaxia. Segundo GHIGO *et al.*, 2010, as observações experimentais de que PI3Ks representam mediadores importantes da cascata de sinalização que conduz ao início da resposta inflamatória, despertou interesse de diversos grupos, no intuito de esclarecer esta participação e desenvolver possíveis alvos terapêuticos.

Dados na literatura indicam que após a infecção *in vitro* por *Flavivirus* como o VEJ e o DENV-2, há nas células infectadas, o aumento da fosforilação da AKT mesmo em estágios precoces da infecção (LEE *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2006). No nosso modelo de infecção por DENV-3, fica evidente a participação da PI3K *in vivo*. Através do Western Blot, podemos verificar a ativação da via da PI3K durante a infecção pelo DENV. Adicionalmente, através da análise do Western Blot, observamos a fosforilação dos produtos AKT e NF- κ B principalmente no 5º dia após a infecção.

O nosso modelo de infecção por DENV-3 é caracterizado por importantes alterações hematológicas, como acentuada trombocitopenia e hemoconcentração. De modo interessante, os nossos resultados demonstraram que nos animais PI3K γ ^{-/-} infectados, não houve alterações hematológicas significativas, sendo que estes animais apresentaram níveis de plaquetas circulantes e porcentagem de hematócrito similares aos animais controles (não-infectados), o que difere dos animais selvagens infectados. Isso vem de encontro aos estudos desenvolvidos por GOERGE *et al.*, 2008, no qual demonstraram que as plaquetas além de mediar a formação do tampão hemostático, também desempenham uma função importante durante o processo inflamatório. Este trabalho demonstra que, durante a inflamação, as funções pró-trombóticas das plaquetas são reduzidas, e as plaquetas ativadas são capazes de aumentar a expressão de moléculas inflamatórias no endotélio.

Além disso, relataram que anticorpos anti-dengue podem apresentar reações cruzadas com plaquetas, fatores de coagulação e células endoteliais, resultando em trombocitopenia, podendo desencadear hemorragia grave. Assim, em animais PI3K γ ^{-/-} a ausência de trombocitopenia pode estar associada a efeitos indiretos, como por exemplo, menor alteração das células endoteliais, como na morfologia do vaso, ou diminuição dos fatores de agregação de plaquetas ou por efeitos diretos sobre a plaqueta, uma vez que essa apresenta sinalização dependente da via PI3K/AKT (MORELLO *et al.*, 2009).

A migração de neutrófilos para o local é um dos mecanismos centrais do sistema imunológico contra a infecção (GARCIA *et al.*, 2010). PINHO *et al.*, 2007, demonstraram em estudos realizados com camundongos deficientes na subunidade p110 da PI3K γ , a importância desta isoforma na regulação do recrutamento e acúmulo de neutrófilos *in vivo* e constataram também que a migração destas células através do epitélio é dependente da expressão de PI3K γ . Já no nosso modelo em estudo, conforme ilustrado na Figura 10, a redução no recrutamento de neutrófilos nos animais PI3K γ ^{-/-} foi observada através da menor atividade da enzima mieloperoxidase no baço, fígado e pulmões dos animais infectados. Segundo WANG *et al.*, 2002; KOYASU, 2003, uma das possíveis explicações para esta interferência de PI3K na migração deve-se ao fato de que o processo de migração celular requer reorganização dinâmica da estrutura do citoesqueleto e da membrana e é evidente a necessidade de produtos da via PI3K na polaridade celular e em processos como filopodia e formação do fagossoma.

A interação do patógeno com células do sistema imune resulta na produção e liberação de inúmeros mediadores imunes, que são responsáveis por controlar a resposta do hospedeiro. Dentre estes mediadores, podemos citar as citocinas e quimiocinas. Diversos estudos relatam a presença de citocinas como IL-6, TNF- α , IL-8, MCP-1, CCL2 e IFN- γ no soro de pacientes infectados com *Dengue virus*, e mais, pacientes que desenvolveram a forma mais grave da doença, na maioria das vezes, apresentaram níveis elevados destas citocinas nas fases tardias da infecção em relação aos pacientes que desenvolveram a forma clássica da doença (CHATURVEDI *et al.*, 2000; LIBRATY *et al.*, 2002; MANGADA *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2005). Além disso,

trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo também apresentam características similares, com a participação de diversos mediadores inflamatórios no processo de infecção pelo *Dengue virus* adaptado ao hospedeiro murino (SOUZA *et al.*, 2009; ASSUNCAO-MIRANDA *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2010; GUABIRABA *et al.*, 2010; FAGUNDES *et al.*, 2011a; COSTA *et al.*, 2012). No nosso presente estudo, observamos uma diminuição significativa na produção de IL-6, TNF- α , IFN- γ e da quimiocina CXCL-1 no baço e soro dos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ quando comparados aos seus controles selvagens infectados (Figura 11). Diversos trabalhos relatam a importância de citocinas como IL-6 e TNF- α em respostas inflamatórias sistêmicas. O TNF- α é um importante regulador da imunidade inata e da inflamação aguda. No entanto, em níveis elevados, a citocina em questão é uma importante causa de complicações sistêmicas, dentre elas o choque (CHATURVEDI, 2006). O papel do TNF- α na patogênese do dengue é crítico e, provavelmente, inicia os vários processos que estão relacionados com extravasamento plasmático (ATRASHEUSKAYA *et al.*, 2003). Já a citocina IL-6 é produzida principalmente por mastócitos e por células endoteliais e está relacionada ao aumento da permeabilidade vascular. IFN- γ é classicamente conhecido por sua atividade antiviral e existem relatos na literatura de que animais deficientes para IFN- γ são altamente susceptíveis à infecções de diversas origens, inclusive pelo *Dengue virus* (DINARELLO, 1999; BROMBACHER *et al.*, 2003, FAGUNDES *et al.*, 2011a; COSTA *et al.*, 2012). Muitas infecções virais induzem a expressão de quimiocinas, como CXCL-1, que estão envolvidas no recrutamento e ativação de leucócitos para os sítios de infecção. Sabe-se que DENV, como as demais infecções virais é capaz de induzir a expressão dessa quimiocina (CHEN *et al.*, 2006; RENNISON *et al.*, 2011). Como os animais, objeto deste estudo, são deficientes para PI3K γ , podemos inferir que a menor produção de citocinas e quimiocinas estaria diretamente relacionado a uma modulação de resposta imune controlada, gerando menos danos ao organismo, diferente do que ocorre nos animais selvagens. Um dos mecanismos de ação da PI3K γ pode estar relacionado ao fato de que a presença desta facilita o processo de interação entre células de defesa, como, por exemplo o neutrófilo, e o endotélio inflamado (COSTA *et al.*, 2011).

Já é descrito na literatura que infecção por DENV causa danos hepáticos significativos. No nosso modelo, conforme ilustrado por SOUZA *et al.*, 2000a; FAGUNDES *et al.*, 2011a; COSTA *et al.*, 2012, há um grande comprometimento hepático, com alterações na estrutura e fisiologia do órgão, assim como um aumento dos níveis de transaminases hepáticas presente no soro dos animais infectados. Demonstramos também a presença de antígenos virais, como proteína NS1 e NS3 no fígado dos animais, assim como diversos parâmetros como edema de hepatócitos, hemorragia, necrose, degeneração e infiltrado inflamatório, composto por neutrófilos, macrófagos e linfócitos. COSTA *et al.*, 2012, correlacionam ainda a possibilidade desses danos estarem diretamente relacionados a alta carga viral presente no fígado dos animais infectados. Dados da literatura e deste trabalho corroboram com os resultados apresentados por COSTA *et al.*, 2012, o qual demonstra que o envolvimento do fígado durante a patogênese do *Dengue virus* é claro, como sendo um órgão alvo da infecção e replicação do vírus. Em contrapartida, os animais deficientes para PI3K γ apresentaram menores danos hepáticos, conforme ilustrado na figura 12. Neste trabalho, através da análise histológica, podemos observar uma preservação na arquitetura do fígado nestes animais deficientes, assim como podemos ver que os níveis de transaminases hepáticas estão indiscutivelmente alterados nos animais WT infectados, quando comparados aos animais PI3K γ ^{-/-}, que, por sua vez, apresentam níveis similares aos animais não infectados. Ainda, podemos observar que todos os parâmetros avaliados na graduação de dano histopatológico estão diminuídos nos animais PI3K γ ^{-/-} quando comparados aos animais WT. PAES *et al.*, 2009, relatam resultados similares aos do nosso grupo, com danos hepáticos significativos e presença de antígenos virais no órgão. Podemos concluir que os animais deficientes para PI3K γ possuem um menor comprometimento hepático, que é característico da doença, conforme demonstrado por COSTA *et al.*, 2012, o que está relacionado com os demais resultados do nosso estudo, como menor infiltrado neutrofílico e menor produção de mediadores inflamatórios.

Dados na literatura indicam que após a infecção *in vitro* por *Flavivirus* como o VEJ e o DENV-2, há nas células infectadas, como a N18, uma linhagem de neuroblastoma murino, o aumento da fosforilação da AKT mesmo

em estágios precoces da infecção. Além disso, o bloqueio da PI3K por um inibidor inespecífico da enzima (LY294002 ou Wortmannin) foi responsável pela geração de maiores efeitos citopáticos dos vírus nas células infectadas em estágios precoces da infecção, contudo o bloqueio dessa via não interferiu na replicação viral e nem na produção de proteínas virais após a infecção. Os autores atribuem estes elevados efeitos citopáticos ao aumento da apoptose das células infectadas (LEE *et al.*, 2005). Interessantemente, observamos no nosso modelo uma redução significativa na carga viral presente no baço, sangue e fígado dos animais deficientes para PI3K γ infectados, quando comparados aos seus controles selvagens. Esses dados podem corroborar com o estudo de MCLEAN *et al.*, 2011, o qual relata que grande parte da patologia associada a infecções *in vivo* de *Dengue virus* pode resultar da apoptose causada por *Flavivirus* durante o curso da infecção. Além disso, este mesmo trabalho conclui que DENV-2 induz autofagia e que este processo é importante para a replicação viral em células infectadas, como hepatócitos. Uma consequência comum da sinalização da autofagia é o aumento da regulação de pró-sobrevivência da célula, o que correlaciona estes dados com a via da PI3K. Conforme já descrito, PI3K está relacionada com processos fisiológicos do organismo, como o mecanismo de apoptose. Neste estudo, MCLEAN *et al.*, 2011, concluíram que a proteína viral NS4 é a responsável por induzir uma autofagia dependente de PI3K, protegendo contra a morte celular. No nosso modelo, podemos ter um mecanismo parecido, no qual a ausência de PI3K γ seria crucial para o controle da replicação viral, uma vez que não há o processo de autofagia dependente dessa via, culminando na morte celular e consequente não replicação viral. Outra possível explicação para a redução da carga viral vista nos animais deficientes para PI3K γ pode estar relacionada ao processo de penetração da partícula viral na célula hospedeira. Segundo EHRHARDT & LUDWIG, 2009, a via da PI3K e seus produtos parecem regular também este passo do processo de replicação viral, uma vez que quando inibiu-se PI3K, observou-se um acúmulo de partículas de *Influenza A virus* na superfície celular.

Ainda em concordância com os dados presentes na literatura, de que a via da PI3K está relacionada a ativação de moléculas e mecanismos nos hepatócitos (OSAWA *et al.*, 2002), podemos observar um número

significativamente elevado de hepatócitos positivos para a proteína viral NS3 nos animais selvagens infectados, o que está em um número extremamente menor nos animais deficientes para PI3K γ (Figura 14), o que corrobora com o resultado da presença da carga viral no fígado desses animais. MCLEAN *et al.*, 2011, relatam a indução, por DENV-2, de autofagia dependente de PI3K. Como o processo de autofagia está relacionado com a replicação viral, os animais deficientes para PI3K γ apresentam menor número de hepatócitos positivos para NS3.

Podemos observar na Figura 8 uma proteção dos animais PI3K γ ^{-/-} após a infecção pelo DENV-3 verificada através da maior sobrevivência destes animais, visto que a letalidade destes foi em torno de 10%, enquanto que nos animais WT, infectados com o mesmo inóculo viral, foi observada letalidade de aproximadamente 60%. Este dado corrobora e ilustra todos os demais dados apresentados, com os quais podemos inferir que os animais deficientes para PI3K γ apresentam uma proteção durante a infecção, com uma resposta inflamatória mais controlada. Torna-se importante ressaltar que resultados semelhantes foram encontrados também após a infecção por DENV-2, fato que valida ainda mais o nosso modelo de estudo e reforça a importância da via de PI3K γ na patogênese do dengue experimental.

CONCLUSÕES

A via da PI3K γ desempenha um papel importante no organismo. Este papel tem como destaque a participação efetiva desta via como sinalizadora em processos inflamatórios, como já descrito na literatura. Com base nos

estudos e no desenvolvimento do nosso modelo, podemos inferir que a PI3Ky possui uma função importante durante a infecção pelo *Dengue virus* em camundongos, haja visto que os animais deficientes apresentam uma resposta imune mais controlada, lesionando menos o organismo.

Com estes resultados apresentados, podemos ver que os animais PI3K $\gamma^{-/-}$ apresentaram proteção quando infectados com DENV-3, dados que são de grande importância para o entendimento da patogênese da dengue, uma vez que os estudos sobre esta ainda são incipientes. Com experimentos futuros, como o bloqueio da via da PI3Ky, através do uso de inibidor específico, podemos confirmar a importância desta via no desenvolvimento da doença e sugerir um novo alvo terapêutico para o controle da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 10, p. 1533-49, Oct 2009.

ALEXANDER, N. et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. **Trop Med Int Health**, May 30 2011.

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

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

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

_____. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 6, p. 1059-62, Dec 2005.

BROMBACHER, F.; KASTELEIN, R. A.; ALBER, G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. **Trends in immunology** v. 24, n. 4, p. 207-212, 2003.

CAMPS, M. et al. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. **Nat Med**, v. 11, n. 9, p. 936-43, Sep 2005.

CELLI, J.; OLIVIER, M.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic Escherichia coli mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. **EMBO J**, v. 20, n. 6, p. 1245-58, Mar 15 2001.

CHANG, T. H.; LIAO, C. L.; LIN, Y. L. Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF-kappaB activation. **Microbes Infect**, v. 8, n. 1, p. 157-71, Jan 2006.

CHATURVEDI, U. C. Tumour necrosis factor & dengue. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 1, p. 11-4, Jan 2006.

CHATURVEDI, U. C. et al. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 28, n. 3, p. 183-8, Jul 2000.

CHAVEZ-SALINAS, S. et al. Heat shock effect upon dengue virus replication into U937 cells. **Virus Res**, v. 138, n. 1-2, p. 111-8, Dec 2008.

CHEN, J. P. et al. Dengue virus induces expression of CXC chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate. **J Immunol**, v. 177, n. 5, p. 3185-92, Sep 1 2006.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nat Med**, v. 3, n. 8, p. 866-71, Aug 1997.

CHEUNG, R. et al. Activation of MDL-1 (CLEC5A) on immature myeloid cells triggers lethal shock in mice. **J Clin Invest**, v. 121, n. 11, p. 4446-61, Nov 2011.

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

COORAY, S. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 5, p. 1065-76, May 2004.

COSTA, C.; MARTIN-CONTE, E. L.; HIRSCH, E. Phosphoinositide 3-kinase p110gamma in immunity. **IUBMB Life**, v. 63, n. 9, p. 707-13, 2011.

COSTA, V. V. et al. A Model of DENV-3 Infection That Recapitulates Severe Disease and Highlights the Importance of IFN-gamma in Host Resistance to Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1663, May 2012.

COUGHLIN, C. M. et al. Approaches and limitations of phosphatidylinositol-3-kinase pathway activation status as a predictive biomarker in the clinical development of targeted therapy. **Breast Cancer Res Treat**, v. 124, n. 1, p. 1-11, Nov 2010.

DEEN, J. L. et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 170-3, Jul 8 2006.

DIGNAM, J. D.; LEOVITZ, R. M.; ROEDER, R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. **Nucleic Acids Res**, v. 11, n. 5, p. 1475-89, Mar 11 1983.

DINARELLO, C. A. Interleukin-18. **Methods**, v. 19, p. 121-132, 1999.

EHRHARDT, C.; LUDWIG, S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 863-71, Jun 2009.

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**, v. 5, n. 12, p. e1449, Dec 2011a.

_____. Therapeutic Opportunities in Dengue Infection. **Drug Development Research**, v. 72, p. 480-500, 2011b.

GARCIA, C. C. et al. The development of anti-inflammatory drugs for infectious diseases. **Discov Med**, v. 10, n. 55, p. 479-88, Dec 2010.

- GERMI, R. et al. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology**, v. 292, n. 1, p. 162-8, Jan 5 2002.
- GHIGO, A. et al. PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. **Bioessays**, v. 32, n. 3, p. 185-96, Mar 2010.
- GOERGE, T. et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4958-64, May 15 2008.
- GUABIRABA, R. et al. Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15680, 2010.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, Dec 2010.
- HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-52, Nov 10 2007.
- HALSTEAD, S. B. et al. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 10, p. 712-22, Oct 2010.
- HIRSCH, E. et al. Central Role for G Protein-Coupled Phosphoinositide 3-Kinase γ in Inflammation. **Science**, v. 287, p. 1049–1053, 2000.
- HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infect Genet Evol**, v. 3, n. 1, p. 19-28, May 2003.
- KAWAGUCHI, I.; SASAKI, A.; BOOTS, M. Why are dengue virus serotypes so distantly related? Enhancement and limiting serotype similarity between dengue virus strains. **Proc Biol Sci**, v. 270, n. 1530, p. 2241-7, Nov 7 2003.
- KONG, D. X.; YAMORI, T. ZSTK474, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor identified using the JFCR39 drug discovery system. **Acta Pharmacol Sin**, v. 31, n. 9, p. 1189-97, Sep 2010.
- KOYASU, S. The role of PI3K in immune cells. **Nat Immunol**, v. 4, n. 4, p. 313-9, Apr 2003.
- KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 5-6, p. 329-40, Sep 2007.
- KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annu Rev Microbiol**, v. 62, p. 71-92, 2008.
- LEE, C. J.; LIAO, C. L.; LIN, Y. L. Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. **J Virol**, v. 79, n. 13, p. 8388-99, Jul 2005.

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

LIGON, B. L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment, and prevention. **Semin Pediatr Infect Dis**, v. 16, n. 1, p. 60-5, Jan 2005.

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

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

MALAVIGE, G. N. et al. Dengue viral infections. **Postgrad Med J**, v. 80, n. 948, p. 588-601, Oct 2004.

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

MANSELL, A. et al. Internalin B activates nuclear factor-kappa B via Ras, phosphoinositide 3-kinase, and Akt. **J Biol Chem**, v. 276, n. 47, p. 43597-603, Nov 23 2001.

MARONE, R. et al. Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1784, n. 1, p. 159-85, Jan 2008.

MARTELLI, A. M. et al. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. **Oncotarget**, v. 1, n. 2, p. 89-103, Jun 2010.

MCLEAN, J. E. et al. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. **J Biol Chem**, v. 286, n. 25, p. 22147-59, Jun 24 2011.

MILLER, J. L. et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, p. e17, Feb 8 2008.

MONATH, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 7, p. 2395-400, Mar 29 1994.

MORELLO, F.; PERINO, A.; HIRSCH, E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. **Cardiovasc Res**, v. 82, n. 2, p. 261-71, May 1 2009.

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

MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 699-708, Sep 2008.

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

OKKENHAUG, K.; VANHAESEBROECK, B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 4, p. 317-30, Apr 2003.

OSAWA, Y. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes. **Infect Immun**, v. 70, n. 11, p. 6294-301, Nov 2002.

PAES, M. V. et al. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. **Lab Invest**, v. 89, n. 10, p. 1140-51, Oct 2009.

PICHYANGKUL, S. et al. A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. **J Immunol**, v. 171, n. 10, p. 5571-8, Nov 15 2003.

PINHO, V. et al. Tissue- and stimulus-dependent role of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo. **J Immunol**, v. 179, n. 11, p. 7891-8, Dec 1 2007.

_____. Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 5, p. 800-10, May 2005.

RENNESON, J. et al. A detrimental role for invariant natural killer T cells in the pathogenesis of experimental dengue virus infection. **Am J Pathol**, v. 179, n. 4, p. 1872-83, Oct 2011.

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R. et al. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. **J Virol**, v. 84, n. 9, p. 4845-50, May 2010.

ROSS, T. M. Dengue virus. **Clin Lab Med**, v. 30, n. 1, p. 149-60, Mar 2010.

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

SASAKI, T. et al. Function of PI3K in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. **Science**, v. 287, p. 1040-1046, 2000.

SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **N Engl J Med**, v. 366, n. 15, p. 1423-32, Apr 12 2012.

SMIT, J. M. et al. Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, v. 3, n. 2, p. 160-71, Feb 2011.

SOUSA, L. P. et al. Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 4, p. 396-405, Aug 15 2009.

SOUZA, D. G. et al. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **Br J Pharmacol**, v. 131, n. 8, p. 1800-8, Dec 2000a.

_____. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 403, n. 1-2, p. 121-8, Sep 1 2000b.

_____. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 33, p. 14138-43, Aug 18 2009.

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

VANHAESEBROECK, B. et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 535-602, 2001.

VANHAESEBROECK, B.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 3, p. 195-203, Mar 2012.

VANHAESEBROECK, B.; WATERFIELD, M. D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. **Exp Cell Res**, v. 253, n. 1, p. 239-54, Nov 25 1999.

WANG, F. et al. Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 513-8, Jul 2002.

WARD, S. G.; FINAN, P. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents. **Curr Opin Pharmacol**, v. 3, n. 4, p. 426-34, Aug 2003.

WELSH, R. M.; ROTHMAN, A. L. Dengue immune response: low affinity, high febrility. **Nat Med**, v. 9, n. 7, p. 820-2, Jul 2003.

WERNER, M.; HOBEIKA, E.; JUMAA, H. Role of PI3K in the generation and survival of B cells. **Immunol Rev**, v. 237, n. 1, p. 55-71, Sep 2010.

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

WIETEN, R. W. et al. Dengue in travellers: applicability of the 1975-1997 and the 2009 WHO classification system of dengue fever. **Trop Med Int Health**, Jun 12 2012.

WILLIAMS, D. L.; OZMENT-SKELTON, T.; LI, C. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway alters host response to sepsis, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Shock**, v. 25, n. 5, p. 432-9, May 2006.

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

YIN, Z. et al. An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 48, p. 20435-9, Dec 1 2009.