

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Caio Tavares Fagundes

*Papel do IFN- γ e do Óxido Nítrico na patogênese do
dengue experimental em camundongos*

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira
Co-orientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza

BELO HORIZONTE

2007

Caio Tavares Fagundes

***Papel do IFN- γ e do Óxido Nítrico na patogênese do
dengue experimental em camundongos***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Co-orientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza

Belo Horizonte

2007




Universidade Federal de Minas Gerais -
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615

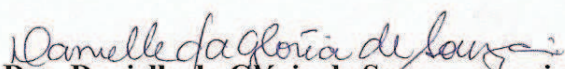


ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CAIO TAVARES FAGUNDES. Aos três dias do mês de agosto de 2007 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Papel do interferon- γ e do óxido nítrico na patogênese do dengue experimental em camundongos” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão Prof. Mauro Martins Teixeira da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Luís Carlos Crocco Afonso da Universidade Federal de Ouro Preto, aprovado; Dr. Oscar Bruña Romero da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dra. Danielle da Glória de Souza, co-orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Mauro Martins Teixeira, orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 3 de agosto de 2007.


 Dr. Luís Carlos Crocco Afonso – UFMG


 Profa. Andréa Mara Macedo
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em
 Bioquímica e Imunologia
 Instituto de Ciências Biológicas - UFMG


 Dr. Oscar Bruña Romero – UFMG


 Dra. Danielle da Glória de Souza – co-orientadora - UFMG


 Dr. Mauro Martins Teixeira – orientador - UFMG

Dedico este trabalho
que aqui se encerra
a cinco pessoas:

Aos meus Pais, Carlos e Tânia, não pela
vida, mas por me mostrarem como
vivê-la com tanta maestria;

A Daniel e Pedro, pelo
companheirismo, amizade e apoio.

À Larissa, pelo carinho, apoio
incondicional e
compreensão

AGRADECIMENTOS

Neste espaço, gostaria de agradecer a cada um dos inúmeros amigos que tanto me ajudaram ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Infelizmente o espaço e o tempo são curtos. Então, peço desculpas por algum lapso de memória. Apenas deixo claro que sou extremamente grato a todos e dedico este trabalho também ao esforço de cada um de vocês.

Primeiramente, agradeço infinitamente ao Prof. Mauro e a Profa. Danielle. Pela confiança, pelos incentivos, pelo conhecimento, pelo aprendizado, pela amizade. Estes 4 anos no laboratório têm sido ótimos e qualquer palavra agora parece insignificante perto do quanto sou grato e o quanto me orgulho pelo que aprendi com eles.

Aos meus caros colegas do laboratório de Imunofarmacologia. São muitos, os bons amigos. Agradeço muito a todos, os que permanecem no laboratório e aqueles que já o deixaram, pela ajuda diária e pelo ambiente agradável!

Agradeço ao amigo Flávio Amaral, pela constante ajuda com os experimentos e pelas discussões diárias. Dedico grande parte desse trabalho ao esforço dele também. Da mesma forma, agradeço de forma especial à Landa, ao Rafael e à Carla Zirke, pela imprescindível ajuda com as titulações e à Tiça, pelas ajudas na preparação das amostras e ELISAs. Ao Rodrigo, pela ajuda com os ensaios de Griess (e pela insanidade). Finalmente, agradeço muito ao Daniel, pela paciência com inúmeros protocolos experimentais frustrados, mesmo que repetidos no domingo à tarde, e pela oportunidade de ensinar e aprender (de forma bastante divertida, diga-se de passagem). Agradeço à Valdinéria, à Ilma e à Dora, pela ajuda diária.

Agradeço também aos inúmeros amigos do departamento de Bioquímica e Imunologia e do ICB, colegas do curso de Bases e da graduação em Biologia. De maneira especial, à Cláudia, aluna da professora Leda, Héilton e Ester, Miriam Costa, Luciano e Felipe (aluno da Profa. Virgínia), pelas ajudas com as PCRs, ao Juan, que me ajudou com os ensaios de nitrato e , ao Diogo, pela ajuda com a marcação para FACS.

Agradeço também ao Professor Fernando Cunha e ao Sílvio Vieira, da USP de Ribeirão Preto, pela disponibilidade de ajudar com ensaios de dosagem de nitrato e com a PCR, e à Profa. Leda Vieira, deste departamento, pelos animais experimentais, e à Prof. Erna Kroon do departamento de Microbiologia, pela estrutura para a titulação de vírus. E ainda, aos Prof. Bernhanrd Ryffel e Valerie Quesnaux, Stephanie Rose e Tatiana Victoni, do CNRS-Orléans, pela cordialidade, disponibilidade e ajuda durante os experimentos na França. Finalmente, aos técnicos do CEBIO.

Agradeço aos Prof. Oscar Romero, Leda Vieira, Luis Carlos Crocco e Vanessa Pinho por aceitarem participar da banca e possibilitarem meu crescimento e aprimoramento.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo suporte financeiro.

De maneira especial, gostaria de agradecer muito à Dani Souza e à Dani Sachs, ao Flávio e ao Daniel pela inestimável ajuda de última hora com a dissertação. Não tenho palavras, nem como retribuir.

Obviamente, agradeço muito e dedico este trabalho à minha família. Aos meus pais, Carlos e Tânia, pela dedicação e apoio inigualáveis, pelas experiências compartilhadas e por todo o esforço e paciência. Aos meus irmãos, amigos inseparáveis, também pelo apoio e companheirismo. Agradeço à Lari, pela compreensão e paciência com as ausências e por todo apoio nos momentos difíceis.

Enfim, meu sincero agradecimento a todos, seja qual for o motivo e a intensidade da contribuição. Muito Obrigado!

***LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E
SÍMBOLOS***

APC – *Antigen-presenting cell* – Célula apresentadora de antígenos
BSA – *Bovine serum albumin* – Albumina de soro bovino
CCL2 (MCP-1) - *Monocyte chemoattractant protein-1*
CD () - *cluster of differentiation* ()
cm – centímetro – unidade de comprimento
CO₂ - Dióxido de carbono
CXCL1 (KC) - *keratinocyte chemokine*
DC- *Dendritic cells* – células dendríticas
DC-SIGN - *Dendritic cell- specific intracellular adhesion molecule 3(ICAM-3)-grabbing nonintegrin*
DEN-2 – vírus da dengue sorotipo 2
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
EDTA - *EthyleneDiamineTetracetic acid* - Ácido etilendiamino tetraacético
ELISA – *Ezyme linked immunosorbent assay*
EPM – Erro padrão da média
ERN - espécies reativas de nitrogênio
FD - febre do dengue
FHD - febre hemorrágica do dengue
g – grama – unidade de massa
GAS – *IFN-γ-activated sequence*
GRP78/BiP - *78-kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin-binding protein*
h – hora – unidade de tempo
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
HLA - *Human leukocyte antigen*
Hsp - *heat shock protein*
HTAB - *hexadecyltrimethylammonium*
IASP - *International Association for the Sdudy of Pain*
IFNGR - *interferon gamma receptor*
IFN-γ – *interferon gamma*

IL- () – *interleucin* - ()
iNOS - *Inducible Nitric Oxide Synthase*
IRF- *Interferon regulatory factor*
ISRE - *interferon-stimulated response element*
JAK- *Janus kinase*
KI - *kalicrein unit*
L-SIGN - *liver/lymph node- specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*
M – molar – unidade de medida de concentração
MEM - *Modified Eagle's Medium*
mim – minutos – unidade de tempo
mL – mililitro – unidade de volume
mm² – milímetro quadrado – unidade de área
MPO - *Myeloperoxidase*
MTT - *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium
Bromide Thiazole Blue*
n – número de repetições
NaCl - Cloreto de sódio
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaPO₄ - Fosfato de sódio
nd - não detectável
NK – *Natural Killer*
nm – nanômetro – unidade de comprimento
NO – *Nitric oxide* – Óxido nítrico
NOS – *Nitric Oxide Synthase*- Óxido nítrico sintase
°C - grau Celsius, escala de medida de temperatura
OD – optical density
OPD - *o-phenylenediamine dihydrochloride*
p/v – peso por volume – unidade de medida de concentração
PBS - *phosphate-buffered saline*
PFU - *Plaque-forming unit* – unidade formadora de placas
pg – picograma – unidade de massa
PKR - *protein kinase regulated by double-stranded RNA*

RNA- *ribonucleic acid*- ácido ribonucleíco
SCD - Síndrome de Choque do Dengue
SDS - *Sodium dodecyl sulfate*
SFB - *serum fetal bovine*
STAT- *Signal Transducers and Activators of Transcription protein*
Th() – linfócitos T auxiliares do tipo ()
TNF- α - *Tumor necrosis factor-alfa*
U/mL - unidade por mililitro, unidade de medida de concentração
WT – *Wild type*
 $\mu\text{g/mL}$ - micrograma por mililitro, unidade de medida de concentração
 μL – microlitro – unidade de volume

RESUMO

A dengue é hoje a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui um sério problema de saúde pública no mundo, especialmente nos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor. Embora o conhecimento sobre a patogênese da doença seja incipiente, atribui-se um importante papel às citocinas na resposta do hospedeiro à infecção. Dentre estas podemos destacar o IFN- γ , uma citocina com importante função na imunidade contra agentes infecciosos. Neste trabalho, avaliamos o papel desempenhado pelo IFN- γ e por uma de suas moléculas efetoras, o óxido nítrico (NO), na resposta à infecção pelo vírus da dengue. Para isso, foi utilizado um modelo experimental, baseado na infecção de camundongos com uma isolado clínico de Dengue-2 previamente adaptado ao hospedeiro murino. Camundongos selvagens liberam IFN- γ após serem infectados com o vírus da dengue. Além disso, animais deficientes na expressão do IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) apresentaram taxas elevadas de letalidade após a infecção com o vírus da dengue. Esta baixa sobrevivência foi associada a uma manifestação agravada da doença quando comparados com animais selvagens infectados, como demonstrado pelo aumento da plaquetopenia, hemoconcentração e hipernocicepção encontrada nestes animais, além de níveis sistêmicos de TNF- α e IL-6 elevados. Além disso, houve prejuízo na produção de quimiocinas no fígado de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados e aumento do infiltrado neutrofílico para o pulmão em relação ao observado nos controles selvagens infectados. Esta maior susceptibilidade à infecção foi caracterizada por prejuízo no controle da replicação viral após a infecção, fato que inferimos estar associado à menor capacidade desses animais em produzir o NO. De fato, a produção do gás, catalisada pela enzima iNOS, se mostrou importante durante a infecção, como evidenciado pela susceptibilidade aumentada dos animais iNOS $^{-/-}$. Estes animais, de maneira semelhante aos animais IFN- $\gamma^{-/-}$, apresentaram letalidade acentuada

frente à infecção, além de intensa gravidade nos sinais hematológicos como avaliado pelo decréscimo do número de plaquetas e hemoconcentração elevados. Camundongos *iNOS*^{-/-} também apresentaram níveis de TNF- α e IL-6 circulantes elevados, e produção de quimiocinas teciduais e influxo de neutrófilos para o pulmão reduzidos. Por fim, mesmo sendo capazes de produzir IFN- γ , os animais *iNOS*^{-/-} se mostraram inaptos a controlar a replicação do vírus da dengue, como acessado pelo alto título viral encontrado no baço destes animais. Desta forma, concluímos que a produção de óxido nítrico induzida pelo IFN- γ é uma via importante na resposta à infecção pelo vírus da dengue. Na ausência destas moléculas há marcante incapacidade de controle da replicação viral por parte do hospedeiro, levando a uma manifestação mais grave da infecção. Estratégias que elevem a produção das duas moléculas podem resultar em benefícios no controle da infecção primária pelo vírus da dengue.

Palavras-chave:

Infecção, dengue, IFN- γ , *iNOS*, óxido nítrico, inflamação, síndrome da resposta inflamatória sistêmica

ABSTRACT

Dengue is currently the most important mosquito-borne disease that affects humans and constitutes a serious world health problem. Although knowledge about the disease pathogenesis is incipient, an important role is attributed to cytokines in host response to infection. Among them, we highlight IFN- γ , a cytokine with important functions in immunity to infectious agents. In this work, we evaluated the role played by IFN- γ and by one of its effectors molecules, nitric oxide, during the response to Dengue virus infection. For this purpose, we used an animal model based in mice infection with a clinical Dengue-2 isolate, adapted to the murine host. Mice were able to produce IFN- γ after infection with Dengue virus. Furthermore, mice deficient in IFN- γ production (IFN- $\gamma^{-/-}$) presented higher lethality after infection with dengue virus. This reduced survival rate was associated by a more severe disease manifestation when compared to wild type infected mice, as assessed by increase in thrombocytopenia, haemoconcentration and hypernociception, besides elevated systemic TNF- α and IL-6 concentrations. In addition, there was loss in liver chemokine production by infected IFN- $\gamma^{-/-}$, and increased neutrophil influx to lungs, when compared to control wild type infected mice. This enhanced susceptibility to infection was characterized by loss in control of viral replication after infection, what we deduced to be associated with reduced ability of NO-production by IFN- $\gamma^{-/-}$ mice. Hence, iNOS-mediated NO production seemed important during dengue infection, as showed by increased susceptibility of iNOS $^{-/-}$ mice. These animals, akin to IFN- $\gamma^{-/-}$ mice, presented enhanced lethality after infection, in addition to elevated platelet counts and reduced haemoconcentration. iNOS $^{-/-}$ mice also showed exacerbated TNF- α and IL-6 level in circulation, and reduced tissue chemokine content and neutrophil influx to the lung. Finally, even able to produce high levels of IFN- γ during infection, iNOS $^{-/-}$ mice seemed to be unable to control dengue virus replication, as assessed by high viral titers

in spleen of these mice. Then, we conclude that IFN- γ -induced NO production is an important pathway during response to dengue virus infection. In the absence of these two molecules, there is reduced ability of viral replication control by the host, resulting in a more severe disease manifestation. Strategies capable to enhance production of these two molecules may result in benefits during the control of primary infection by Dengue virus.

Keywords:

Infection, dengue, IFN- γ , iNOS, nitric oxide, inflammation, systemic inflammatory response syndrome

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	VIII
RESUMO	XII
ABSTRACT	XV
SUMÁRIO	XVIII
LISTA DE FIGURAS	XXII
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2. OBJETIVOS.....	47
3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1. Vírus.....	52
4.2. Titulação do vírus da Dengue	52
4.3. Animais.....	53
4.4. Determinação dos níveis de citocinas.....	53
4.5. Dosagem de mieloperoxidase (MPO).....	54
4.6. Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes.....	56
4.7. Análise do índice de hematócrito.....	56
4.8. Teste de hipernocicepção.....	56
4.9. Cultura e estimulação <i>in vitro</i> de células dendríticas derivadas da medula óssea para quantificação de citocinas e quimiocinas e Óxido Nítrico.....	57
4.10. Ensaio de viabilidade de células em cultura utilizando o método do MTT.....	59
4.11. Quantificação de nitrito pelo método de Griess	59
4.12. Análise estatística.....	60
4.13. Pesquisa bibliográfica	60

5. RESULTADOS.....	62
5.1. Cinética da produção de IFN- γ após infecção com o vírus da dengue.....	63
5.2. Camundongos deficientes na expressão de IFN- γ apresentaram elevada taxa de letalidade após infecção com o vírus da dengue.....	64
5.3. Animais deficientes na expressão de IFN- γ apresentaram alterações hematológicas e resposta hipernociceptiva exacerbadas após infecção com o vírus da dengue.....	66
5.4. Animais deficientes na expressão de IFN- γ apresentaram níveis elevados de TNF- α e IL-6 após infecção com o vírus da dengue.....	67
5.5. Animais deficientes na expressão de IFN- γ apresentaram maior influxo de neutrófilos para o pulmão.....	70
5.6. A produção de quimiocinas esteve reduzida em animais deficientes na expressão de IFN- γ infectados com o vírus da dengue.....	71
5.7. Animais deficientes na expressão de IFN- γ apresentaram carga viral elevada após infecção com o vírus da dengue.....	73
5.8. Células Dendríticas precisaram do estímulo com IFN- γ para manterem uma produção contínua de NO após infecção com o vírus da dengue.....	74
5.9. Animais que não expressam a enzima iNOS tiveram taxa de mortalidade elevada após infecção com o vírus da dengue.....	76
5.10. As alterações hematológicas desencadeadas pela infecção pelo vírus da dengue foram acentuadas em animais deficientes na expressão de iNOS.....	77
5.11. Animais deficientes na expressão de iNOS apresentaram níveis elevados de TNF- α e IL-6.....	78
5.12. A susceptibilidade aumentada de animais iNOS ^{-/-} não está associada a prejuízo na produção ao IFN- γ	81

5.13. Animais deficientes na expressão de iNOS apresentaram reduzido influxo de neutrófilos para o pulmão e menor produção de quimiocinas após infecção com o vírus da dengue.....	83
5.14. Animais deficientes na expressão de iNOS apresentaram carga viral elevada após infecção com o vírus da dengue.....	84
6. DISCUSSÃO.....	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Casos anuais reportados de Dengue (1995 -2005)	29
Figura 2: Transmissão do vírus da dengue	31
Figura 3: Representação esquemática da ativação do receptor de IFN- γ pelo seu ligante	41
Figura 4: Representação esquemática da síntese do radical NO e da geração de outras espécies reativas de nitrogênio	44
Figura 5: Cinética da produção da citocina IFN- γ em animais selvagens infectados com o vírus da dengue.....	63
Figura 6: Letalidade desencadeada pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens.....	65
Figura 7: Alterações hematológicas e hipernociceptiva desencadeadas pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens.....	67

Figura 8: Produção das citocinas TNF- α e IL-6 desencadeada pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens	69
Figura 9: Influxo de neutrófilos e produção de CXCL1 no pulmão após infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens	71
Figura 10: Produção das quimiocinas CCL2 e CXCL1 desencadeada pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens	72
Figura 11: Quantificação de unidades formadoras de placas (PFU) após a infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens	74
Figura 12: Produção de óxido nítrico por células dendríticas após a infecção com o vírus Dengue-2.....	75
Figura 13: Letalidade induzida pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens.....	77
Figura 14: Alterações hematológicas induzidas pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens.....	78

- Figura 15:** Produção das citocinas TNF- α e IL-6 desencadeada pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens.....80
- Figura 16:** Produção da citocina IFN- γ com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens.....82
- Figura 17:** Influxo de neutrófilos e produção de quimiocinas no pulmão e fígado após infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens.....84
- Figura 18:** Quantificação de unidades formadoras de placas (PFU) após a infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens.....85

***1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA
LITERATURA***

O termo imunidade é derivado da palavra latina *immunitas*, que se refere à proteção contra processos legais que os senadores romanos tinham durante o seu mandato (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Os historiadores acreditam que Tucídides, em Atenas, no século V a.C., foi quem primeiro usou o termo referindo-se a uma infecção que ele chamou de “peste”. Mas é possível que o conceito de imunidade já existisse muito antes disso, como sugere o antigo costume chinês de estimular a imunidade das crianças contra a varíola fazendo-as inalar um pó da lesão cutânea da pele de pacientes que estavam se recuperando da doença (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Deste modo, historicamente, imunidade significava proteção contra doenças infecciosas. As células e moléculas envolvidas na imunidade formam o sistema imunológico (ou sistema imune) e a sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de resposta imune.

A função fisiológica do sistema imune é a defesa contra substâncias estranhas, sejam elas macromoléculas, tais como proteínas ou polissacarídeos, ou microrganismos infecciosos. Dentre os diversos agentes infecciosos capazes de desencadear uma resposta imune por parte de um hospedeiro, podemos destacar os vírus. De fato, estes minúsculos invasores foram identificados pela peculiar habilidade de causar infecções, mesmo após serem submetidos à filtração com filtros de porcelana (ADLER E.M., 2006). Os vírus levam uma existência minimalista: são formados essencialmente por um genoma composto por ácidos nucléicos, envoltos por um capsídeo protéico (e frequentemente por um envelope lipídico) e se reproduzem apenas no interior de células de um hospedeiro apropriado, subvertendo proteínas e vias de sinalização do hospedeiro para sua própria manutenção.

Os vírus tipicamente infectam uma grande variedade de populações celulares utilizando as moléculas normais da superfície celular como receptores para entrarem nas

células alvo. Feito isso, os vírus podem causar lesão tecidual e doença por diversos mecanismos. A replicação viral interfere com a síntese e função das proteínas celulares normais e leva à lesão e, por fim, à morte da célula infectada. Em infecções virais latentes pode haver prejuízo pelo estímulo da síntese de proteínas que alterem determinadas funções celulares (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Deste modo, as respostas imunes aos vírus têm o objetivo de bloquear a infecção e eliminar as células infectadas.

Dentre os diversos vírus capazes de infectar e causar doenças na espécie humana, o vírus da Dengue tem merecido atenção. O registro mais antigo de uma infecção semelhante à causada pelo vírus da dengue consta em uma enciclopédia de medicina chinesa, e data do ano 992 d.C. (GUBLER, 1998). Uma epidemia descrita por Benjamin Rush na Filadélfia, em 1780, era caracterizada pelos seguintes sintomas: febre, dor de cabeça, náusea e vômitos, além de intensas dores musculares e articulares e manifestações hemorrágicas (RIGAU-PÉREZ, 2006). Tal síndrome foi denominada “febre quebra-ossos”. Mais tarde, em Madrid em 1801, uma síndrome similar foi nomeada Dengue, que em espanhol significa dengo, melindre, lamúria, e se refere ao estado lastimável dos acometidos (RIGAU-PÉREZ, 1998). É consenso, no entanto, que apenas no final do século XVIII, uma doença caracterizada como dengue causara epidemias intermitentes na Ásia e nas Américas. Entre os séculos XIX e XX o vírus se disseminou por áreas tropicais e subtropicais (HAYES & GUBLER, 1992; MONATH, 1994).

A forma mais grave da infecção, a febre hemorrágica do dengue, tem seu primeiro registro datado de 1953 em Manila, no leste asiático (HALSTEAD, 1980). Nos últimos 50 anos, este tipo de manifestação se tornou um grave problema de saúde pública no leste asiático e na região pacífica ocidental (HOLMES & TWIDDY, 2003).

Além disso, a cada década o número de casos, de países afetados e a distribuição geográfica da doença têm crescido de forma constante. Estima-se, hoje, que cerca de três bilhões de pessoas, distribuídas por mais de 100 países, estão sob o risco de infecção pelo vírus da Dengue (WHO). Por volta de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas a cada ano e, dentre esses casos, 250 a 500 mil pessoas desenvolvem a forma mais grave da doença (WHO). No que diz respeito ao Brasil, o Ministério da Saúde brasileiro registrou, até maio de 2007, um número superior a 245.000 casos de dengue no país, sendo que 288 destes se manifestaram da forma hemorrágica da infecção, com 38 casos evoluindo para o óbito.

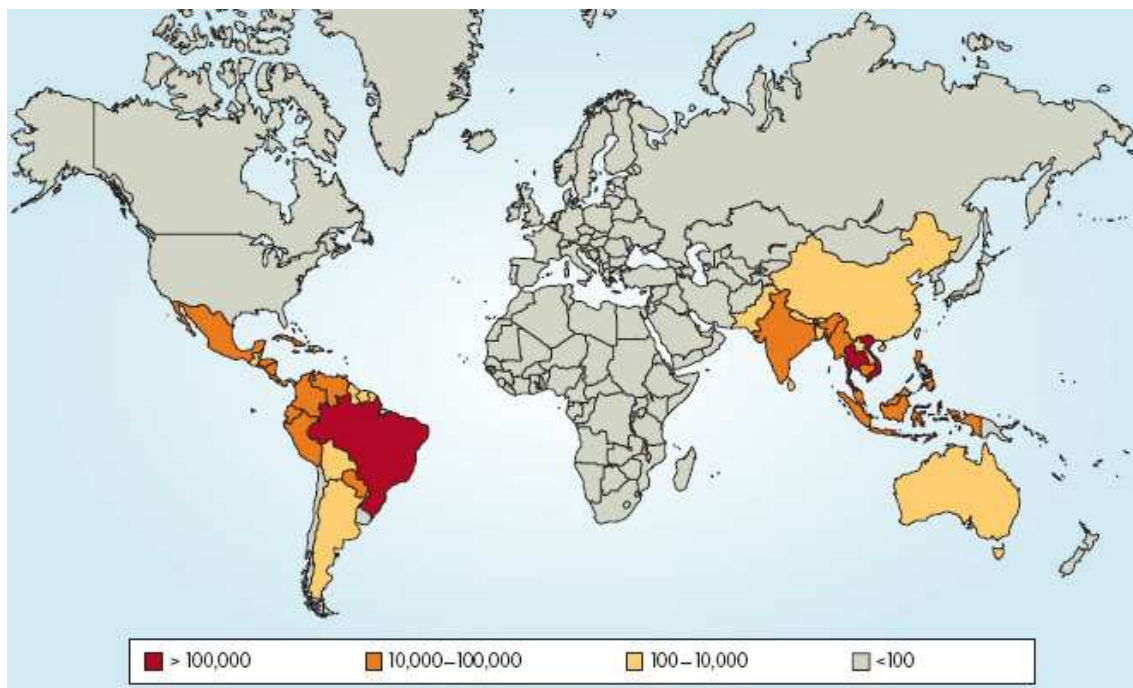


Figura 1: Casos anuais reportados de Dengue (1995-2005). O vírus da Dengue é endêmico na maioria das áreas tropicais e sub-tropicais do mundo. A falta de levantamentos na África durante a década em questão dificulta a obtenção da epidemiologia do vírus no continente. Retirado de WHITEHEAD *et al.*, 2007.

O vírus da dengue é membro da família de vírus envelopados *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, e quatro sorotipos distintos do vírus podem ser encontrados,

nomeados em ordem numérica de 1 a 4 (HOLMES & TWIDDY, 2003). Este gênero inclui outros parasitas humanos transmitidos por mosquitos e carrapatos, dentre os quais destacam-se o vírus da Febre Amarela, o vírus do Nilo Oriental e o vírus da Encefalite Japonesa. O vírus da dengue possui um genoma constituído de uma fita única de RNA, de sentido positivo, formada por cerca de onze mil bases. Sua tradução dá origem a uma poli-proteína grande, cujo processamento co-traducional por enzimas virais e do hospedeiro origina três proteínas estruturais (proteínas C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), envolvidas na replicação viral (CHAMBERS *et al.*, 1990). Os humanos são os principais hospedeiros do vírus da dengue sendo que a transmissão se dá pela picada de fêmeas do mosquito do gênero *Aedes*, especificamente *A. aegypti* e *A. albopictus* (HOLMES & TWIDDY, 2003).

Há consideráveis motivos que explicam um número tão alto de casos de dengue pelo mundo. O modelo de desenvolvimento encontrado em países endêmicos para a doença, especialmente nas áreas urbanas, é um dos principais fatores. Suprimentos de água potável e de serviços de saneamento inadequados levaram a um aumento na reprodução dos mosquitos transmissores (RIGAU-PÉREZ, 1998). A grande concentração de humanos susceptíveis à infecção em proximidade aos mosquitos favoreceu ainda mais a dispersão do vírus nos dois hospedeiros. O aumento da circulação de pessoas, com o desenvolvimento dos meios de transporte modernos, bem como lapsos nas políticas de controle dos vetores são outros fatores apontados para a disseminação da doença (RIGAU-PÉREZ, 2006).

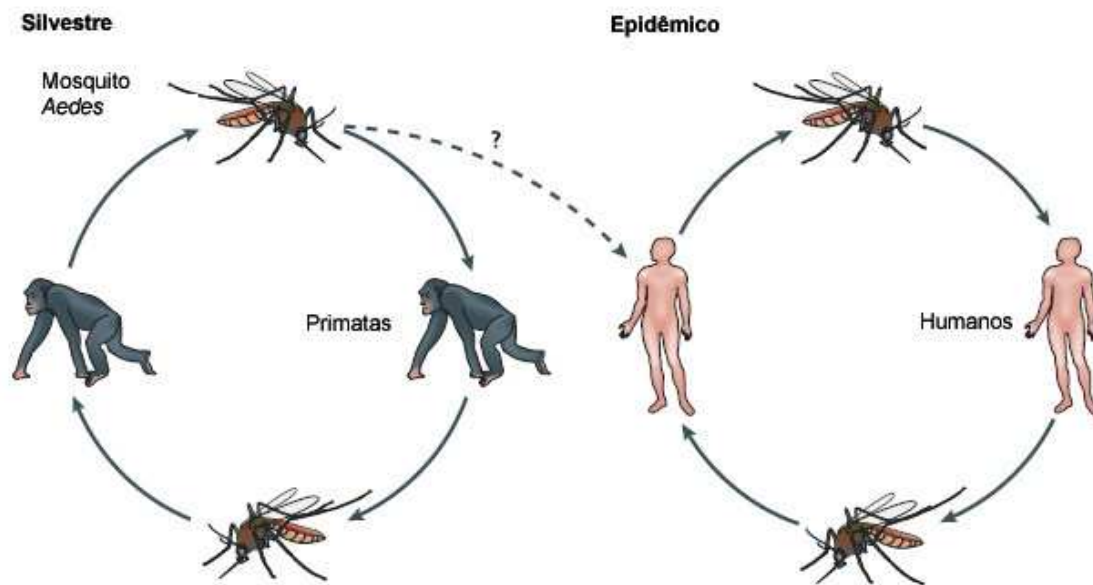


Figura 2: Transmissão do vírus da Dengue. Por causa da alta viremia resultante da infecção pelo vírus da Dengue em humanos, os vírus são eficientemente transmitidos entre mosquitos e humanos, sem necessidade de um outro hospedeiro para amplificação. O Vírus é disseminado especialmente pelo mosquito *Aedes aegypti*, que se reproduz a ambientes domésticos e peri-domésticos com reservatórios de água. Isto facilita o contato entre o mosquito e o humano. Um ciclo silvestre também é descrito para o vírus no oeste africano e sudoeste asiático. Entretanto, a contribuição deste ciclo para a infecção humana é desconhecida e parece ser desprezível. Modificado de WHITEHEAD *et al.*, 2007.

O ciclo de transmissão do vírus da dengue tem início a partir da picada do mosquito em uma pessoa contaminada, onde o vírus presente na circulação é ingerido pelo artrópode (WHITEHEAD *et al.* 2007). Uma vez dentro do mosquito, o vírus se multiplica no intestino médio e, após algum tempo, são encontrados vírus também no ovário, sistema nervoso e nas glândulas salivares, local este por onde o vírus é passível de transmissão. Uma vez presente na circulação sanguínea de um novo hospedeiro, o vírus passa a se multiplicar em células permissivas de órgãos específicos, como o baço, fígado e tecidos linfáticos. O vírus da Dengue tem tropismo por um amplo espectro de células humanas e o principal alvo da infecção pelo vírus ainda é controverso (ANDERSON, R. 2003). Há um consenso geral de que células da linhagem fagocítica

mononuclear (células dendríticas, monócitos/macrófagos, células de Langerhans) são os alvos primários (CLYDE *et al.*, 2006). No entanto, existem evidências de que o vírus é capaz de infectar também linfócitos B, linfócitos T, células *natural killers*, células endoteliais, hepatócitos e neurônios (SCOTT *et al.*, 1980; KING *et al.*, 1999; NEVES-SOUZA *et al.*, 2005; CLYDE *et al.*, 2006).

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

A infecção pelo vírus da Dengue é caracterizada por um amplo espectro de manifestações. Segundo a Organização Mundial de Saúde, além das infecções assintomáticas, as infecções pelo vírus da dengue podem ser classificadas em três categorias distintas: febre indiferenciada, febre do dengue (FD) e febre hemorrágica do dengue (FHD) (DEEN *et al.*, 2006). A primeira apresenta sintomas semelhantes ao de qualquer síndrome viral. FD é a forma clássica da infecção, e se manifesta como um quadro gripal, caracterizado por febre alta, cefaléia, dor retroorbitária, mialgia, artralgia, náuseas e vômitos, diarréia, hipotensão postural, dor abdominal, lombar e de membros inferiores. Além disso, pode haver alterações de pele e mucosas, tais como petéquias. Mesmo sendo a forma clássica, pode haver manifestações hemorrágicas como epistaxe, gengivorragia e hemorragia digestiva (DEEN *et al.*, 2006). Por fim, FHD, a forma grave da doença, inicialmente possui as mesmas manifestações da forma clássica. Os fenômenos hemorrágicos ocorrem no segundo ou terceiro dia da doença e manifestam-se principalmente na pele e tubo digestivo, podendo surgir metrorragias, epistaxes, gengivorragia e outros sangramentos (DEEN *et al.*, 2006). Outros eventos característicos da FHD são plaquetopenia e o aumento da permeabilidade vascular, evidenciados por hemoconcentração e desenvolvimento de efusões pleurais. A FHD pode também ser dividida em quatro graus de gravidade, de acordo com a presença ou ausência de sangramento espontâneo e o grau de extravasamento plasmático. O termo Síndrome de Choque do Dengue (SCD) se refere aos graus III e IV da FHD, sendo que no primeiro há queda da pressão arterial e choque hipovolêmico moderado, ao passo que no último há choque profundo, com pressão sanguínea não detectável (DEEN *et al.*, 2006).

No presente, não há tratamento específico para a doença causada pelo vírus da dengue. O tratamento sintomático apropriado é a opção de escolha. No entanto, o

principal meio de prevenção do dengue é o controle do mosquito vetor, um método dispendioso e geralmente ineficiente, como pode ser comprovado pela expansão do número de casos ocorrida nos últimos anos. Desta forma, o desenvolvimento de tratamentos específicos ou de uma vacina efetiva contra o vírus tem sido considerado prioridade, inclusive pela Organização Mundial da Saúde (ROTHMAN, 2003). O desenvolvimento de modelos animais para a infecção pelo vírus é uma abordagem importante para estudo de potenciais alvos terapêuticos e vacinais.

No entanto, os modelos experimentais animais utilizados atualmente parecem não ser adequados. De fato, a maioria deles não reproduz de maneira fiel as características da infecção vista em humanos (ROTHMAN, 2003). Além de não mimetizar as características fisiopatológicas da doença humana, os modelos animais utilizados atualmente utilizam inóculos com altas cargas virais, o que levam a uma infecção disseminada, aparentemente inconsistente com o que é visto durante a infecção humana (GREEN & ROTHMAN, 2006). Por fim, tais modelos utilizam animais com idades precoces, muitas vezes com o sistema imune ainda em período de maturação, o que impede a extrapolação das informações obtidas para infecção em indivíduos adultos, como acontece na doença humana (ROTHMAN, 2003). Souza *et al* (em preparação) desenvolveram recentemente um modelo que parece reproduzir bem a infecção humana. Trata-se de um modelo de infecção primária baseado na injeção de um isolado clínico do vírus de Dengue adaptado ao hospedeiro murino. A injeção do vírus adaptado é capaz de induzir as principais manifestações características da doença humana, entre elas plaquetopenia e hemoconcentração, hemorragia e morte. Além disso, os camundongos infectados com o vírus adaptado desenvolvem dor inflamatória, outro sintoma marcante da patologia humana mais branda. Desta forma,

o modelo em questão parece ser uma ferramenta interessante para o estudo da fisiologia da infecção pelo dengue.

De fato, a falta de conhecimento sobre a patogênese da doença é evidente. Como exemplo, podemos citar as controvérsias a respeito dos mecanismos envolvidos na manifestação da forma hemorrágica da doença, seja durante uma infecção primária ou secundária. Hipóteses contrastantes têm atribuído a gravidade da doença a fatores virais e do hospedeiro (ROSEN, 1977; HALSTEAD, 1989; ROTHMAN, 2003). Estudos recentes no Peru e Sri Lanka demonstraram a associação da forma hemorrágica da doença a determinados genótipos virais. Alguns determinantes genéticos específicos que explicariam tal associação foram mapeados (WATTS, 1999; MESSER, 2002; MESSER *et al.*, 2003). No entanto, é inviável comprovar se estes elementos genéticos são realmente responsáveis pela virulência ou confirmar qualquer outro mecanismo para a virulência. Alguns estudos, ainda incipientes e com mecanismos mal definidos, associam outros fatores à gravidade da doença, tais como idade, fatores genéticos e estado nutricional do hospedeiro (ROTHMAN, 2003). Por fim, estudos epidemiológicos têm associado a resposta imune do hospedeiro ao vírus e o desenvolvimento da forma hemorrágica da infecção. Vários mecanismos para tal têm sido considerados, tais como deposição de complexos imunes, reação cruzada de anticorpos com endotélio vascular, intensificação da infecção mediada por anticorpos, ativação do sistema complemento e seus produtos, liberação exacerbada de mediadores solúveis, como citocinas, e outros (BOKISCH *et al.*, 1973; THEOFIPOULOS *et al.*, 1976; HALSTEAD, 1979; MALASIT, 1987; HALSTEAD, 1989; MARKOFF, *et al.*, 1991; CHUNGUE, *et al.*, 1994; KURANE, *et al.*, 1994; MORENS, 1994; FALCONAR, 1997; CHATURVEDI, *et al.*, 2000; LIBRATY, *et al.*, 2002; MANGADA, *et al.*, 2004; LIN, *et al.*, 2005).

Fundamental em qualquer discussão sobre a patogênese do dengue está a associação epidemiológica de infecções secundárias com sorotipos heterólogos e a manifestação da FHD (CLYDE *et al.*, 2006). Tal evento foi inicialmente relatado no leste asiático na década de 60 e, desde então, vários estudos, tanto nas Américas, quanto na Ásia, têm confirmado a infecção secundária como um fator de risco para a manifestação da forma mais grave da infecção (BURKE *et al.*, 1988, HALSTEAD, 1970; BALMASEDA *et al.*, 2006; HARRIS *et al.*, 1990; NISALAK *et al.*, 1999). De fato, 90% dos casos de FHD são de infecções secundárias heterólogas, ao passo que os outros 10% ocorrem em infecções primárias, especialmente em crianças (GREEN & ROTHMAN, 2003). A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue confere imunidade duradoura para o sorotipo em questão (GREEN & ROTHMAN, 2003). A homologia entre os diferentes sorotipos é de 65 a 70%, e a imunidade cruzada aos sorotipos heterólogos pode ser encontrada logo após uma infecção primária. No entanto, esta desaparece após cerca de 6 meses e o hospedeiro se torna susceptível aos três sorotipos restantes (GREEN & ROTHMAN, 2003). Acredita-se que a proteção específica contra um determinado sorotipo é devida a ação de anticorpos neutralizantes e à imunidade mediada por linfócitos T de memória específicos, ou a ambos (CLYDE *et al.*, 2006).

O modelo de intensificação da infecção mediada por anticorpos postula que alguns anticorpos específicos contra o vírus da dengue, sejam eles anticorpos de reatividade cruzada provenientes de uma infecção anterior ou anticorpos sub-neutralizantes para um dado sorotipo, podem interagir com o vírus sem que haja neutralização e então, através do uso de receptores Fc γ em macrófagos e monócitos, acentuar a entrada do vírus nas células alvo (CLYDE *et al.*, 2006). Este modelo prediz que anticorpos sub-neutralizantes são, pelo menos em parte, responsáveis pelo risco

aumentado de manifestação da FHD em infecções secundárias. Além dos anticorpos de reatividade cruzada contra outros sorotipos, alguns trabalhos têm relatado que anticorpos anti-Dengue podem apresentar reação cruzada com plaquetas, fatores de coagulação e células endoteliais (FALCONAR, 1997). Tais anticorpos poderiam contribuir para a patogênese durante a infecção pelo dengue por causar destruição de plaquetas (ERFAN *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2000; OISHI *et al.*, 2003; SAITO *et al.*, 2004) . Anticorpos anti-NS1 também parecem se ligar a células endoteliais, levando as mesmas ao processo de apoptose (LIN *et al.*, 2003, 2005). Estes eventos parecem favorecer o aumento da permeabilidade vascular característico da FHD.

A imunopatogênese do dengue provavelmente envolve outros fatores, além de anticorpos circulantes provenientes de infecções prévias. Respostas indesejáveis de linfócitos B e T e efeitos de citocinas tanto nas células infectadas, quanto nas células adjacentes, sejam eles leucócitos, hepatócitos ou células endoteliais, também parecem ser importantes (CLYDE *et al.*, 2006). O modelo do “pecado antigênico original” propõe que uma resposta imune inapropriada a uma infecção secundária se dá pela expansão clonal de linfócitos T de memória de reatividade cruzada que são específicos para a infecção primária e não para a infecção corrente. Isto resultaria em um atraso da eliminação viral e/ou ao aumento da secreção de citocinas (CLYDE *et al.*, 2006). Há evidências que isso pode ocorrer durante infecções secundárias (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003) e alguns trabalhos recentes têm identificado epitopos virais que, no contexto de certos tipos de HLA (*Humas leukocyte antigen*), estão associados com aumento da resposta imune e gravidade da infecção (ZIVNA *et al.*, 2002; SIMMONS *et al.*, 2005; MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2006).

Sejam ou não resultado do “pecado antigênico original”, citocinas desempenham papel fundamental na imunopatogênese da infecção pelo vírus da dengue. Isto se deve

especificamente ao papel pró-inflamatório que elas exercem sobre as células endoteliais. O fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- α) foi a primeira citocina a ser implicada na patogênese da FHD (CHATURVEDI, 2006). Esta pode atuar localmente na ativação de macrófagos, mas a sua liberação sistêmica pode levar ao aumento da permeabilidade vascular (CLYDE *et al.*, 2006). Soro de pacientes com infecção aguda pelo vírus da dengue tem níveis aumentados de TNF- α (VITARANA *et al.*, 1991; HOBER *et al.*, 1993; BOTHELL *et al.*, 1998; CHATURVEDI *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 1999; CHATURVEDI *et al.*, 2000). A associação de TNF- α com manifestações graves da infecção é também confirmada por diferentes modelos animais (ATRASHEUSKAYA *et al.*, 2003; SHRESTA *et al.*, 2006) e por estudos *in vitro* (ERFAN *et al.*, 2003; CARDIER *et al.*, 2005; CHUA *et al.*, 2005). Além de TNF- α , outras citocinas parecem desempenhar papel durante a patogênese da FHD, sendo que as mais comumente associadas são a interleucina (IL)-6, IL-10 e a quimiocina IL-8. Os níveis de todas estas citocinas se encontram elevados em pacientes com FHD (HOBER *et al.*, 1993; INGKARAN *et al.*, 1995; RAGHUPATHY *et al.*, 1998; AVIRUTNAN *et al.*, 1998; GREEN *et al.*, 1999; CHATURVEDI *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 1999). Entretanto, suas ações específicas e suas relações com a gravidade da doença ainda não foram completamente elucidadas.

Outra citocina que parece desempenhar papel importante durante a infecção pelo vírus da dengue é o interferon *gamma* (IFN- γ). Desde os primeiros estudos clínicos, níveis elevados desta citocina foram observados em pacientes com FD ou FHD em relação àqueles de indivíduos saudáveis (KURANE *et al.*, 1993). Além disso, níveis ainda mais acentuados de IFN- γ foram encontrados em indivíduos com FHD em comparação com pacientes com FD (NGUYEN *et al.*, 2004; CHEN *et al.* 2005, 2006b; CHAKRAVARTI *et al.*, 2006). Em paralelo, adultos tailandeses sobreviventes de

infecção pelo vírus da dengue possuíam níveis circulantes de IFN- γ mais elevados, ao passo que aqueles indivíduos que sucumbiram à infecção apresentavam níveis não tão altos da citocina (CHEN *et al.*, 2006b). Modelos animais também sugerem a participação do IFN- γ na resposta do hospedeiro à infecção (SHRESTA *et al.*, 2004, 2005, 2006). No entanto, os modelos utilizados apresentam diferenças marcantes em relação a infecção humana, o que dificulta a extrapolação de resultados. Deste modo, o papel do IFN- γ na resposta à infecção pelo vírus da dengue se mantém obscuro.

O IFN- γ foi identificado 50 anos atrás pela sua atividade antiviral (ISAACS & LINDERMAN, 1957). Os principais produtores desta citocina são células NK, linfócitos T auxiliares ativados do tipo Th1 e linfócitos T citotóxicos CD8⁺. Além desses tipos celulares, linfócitos B, células NKT e algumas células apresentadoras profissionais de antígenos (APC) podem secretar o IFN- γ em certas circunstâncias (BOEHM *et al.*, 1997; SCHRODER *et al.*, 2004). Sua produção é controlada por citocinas secretadas por APCs, especialmente IL-12 e IL-18 e TNF- α , e auto-regulada pelo próprio IFN- γ (SCHRODER *et al.*, 2004).

O IFN- γ é codificado por um gene de cópia única, que gera um mRNA de cerca de 1,2 mil bases (DERYNCK *et al.*, 1982) e uma proteína de 166 resíduos de aminoácidos, incluindo um sinal hidrofóbico clivado de 23 resíduos (RINDERKNECHT *et al.*, 1984). A forma biologicamente ativa é um homodímero não covalente de 34 mil Daltons, com os polipeptídeos arranjados em orientação antiparalela (EALICK *et al.*, 1991; GREENLUND *et al.*, 1992; FOUNTOULAKIS *et al.*, 1992). Seus efeitos biológicos são mediados pela interação com um receptor específico, presente na superfície celular. Tal receptor é ubiquamente, porém não uniformemente, expresso em níveis moderados em todas as células nucleadas (VALENTE *et al.*, 1992). Ele é composto de duas cadeias IFNGR1, que interagem com a citocina, associadas a

duas cadeias IFNGR2, transdutoras de sinais. Tanto IFNGR1, quanto IFNGR2 pertencem à classe II de receptores de citocinas (FARRAR & SCHREIBER, 1993). Estas cadeias não possuem atividade cinase intrínseca, de modo que devem se associar à maquinaria sinalizadora para transdução de sinais (IAGARASHI *et al.*, 1994).

O IFN- γ tem sua sinalização e controle da expressão gênica mediados primariamente pela via Jak-STAT, uma via comum à de uma gama de citocinas, fatores de crescimento e hormônios (SUBRAMANIAM *et al.*, 2001). Esta via envolve o recrutamento do receptor em questão e a ativação de membros da família de cinases Janus (Jaks: Jaks 1-3 e Tyk2) e da família dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição (Stats: Stats 1-6, incluindo Stat 5a e Stat 5b). Estas proteínas são responsáveis pelo controle da transcrição de genes alvos via elementos de resposta específicos (SCHRODER *et al.*, 2004). De maneira mais específica, o dímero de IFN- γ se liga a IFNGR1 na proporção estequiométrica de 2:2 (FOUNTOULAKIS *et al.*, 1992; GREENLUND *et al.*, 1993; BACH *et al.*, 1996; WALTER *et al.*, 1997), levando à auto-fosforilação e ativação de Jak2 (BRISCOE *et al.*, 1996). Este passo permite a fosforilação de Jak1, também por Jak2. Jak1, então, fosforila dois resíduos chaves de tirosina nas duas cadeias de IFNGR1, formando dois sítios de ancoragem para moléculas Stat1 (GREENLUND *et al.*, 1994; IGARASHI *et al.*, 1994; GREENLUND *et al.* 1995; HEIM *et al.* 1995). O par de moléculas Stat1 recrutado é fosforilado, possivelmente por Jak2 (BRISCOE *et al.*, 1996), levando à sua dissociação do receptor e translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, o homodímero se liga a elementos promotores, iniciando ou suprimindo a transcrição de genes (GREENLUND *et al.*, 1994; IGARASHI *et al.*, 1994). Vale ressaltar que muitos dos genes induzidos são também fatores de transcrição (por exemplo, IRF-1, IRF-2 e IRF-9), que são ativados por IFN- γ e que são capazes de regular uma nova onda de transcrição (GREENLUND *et*

al., 1994). Além disso, complexos distintos, tais como Stat1 homodímeros (Stat1:Stat2) e heterodímeros (STAT1:STAT1:IRF-9, STAT1:STAT2:IRF-9), podem ser formados durante o processo de sinalização (DARNELL JR, *et al.*, 1994; BLUYSSSEN *et al.*, 1996; STARK *et al.*, 1998; MATSUMOTO *et al.*, 1999). Estes regulam a transcrição de muitos dos genes induzidos por IFN- γ ao se ligarem aos elementos GAS ou ISRE (PALUDAN, 1998).

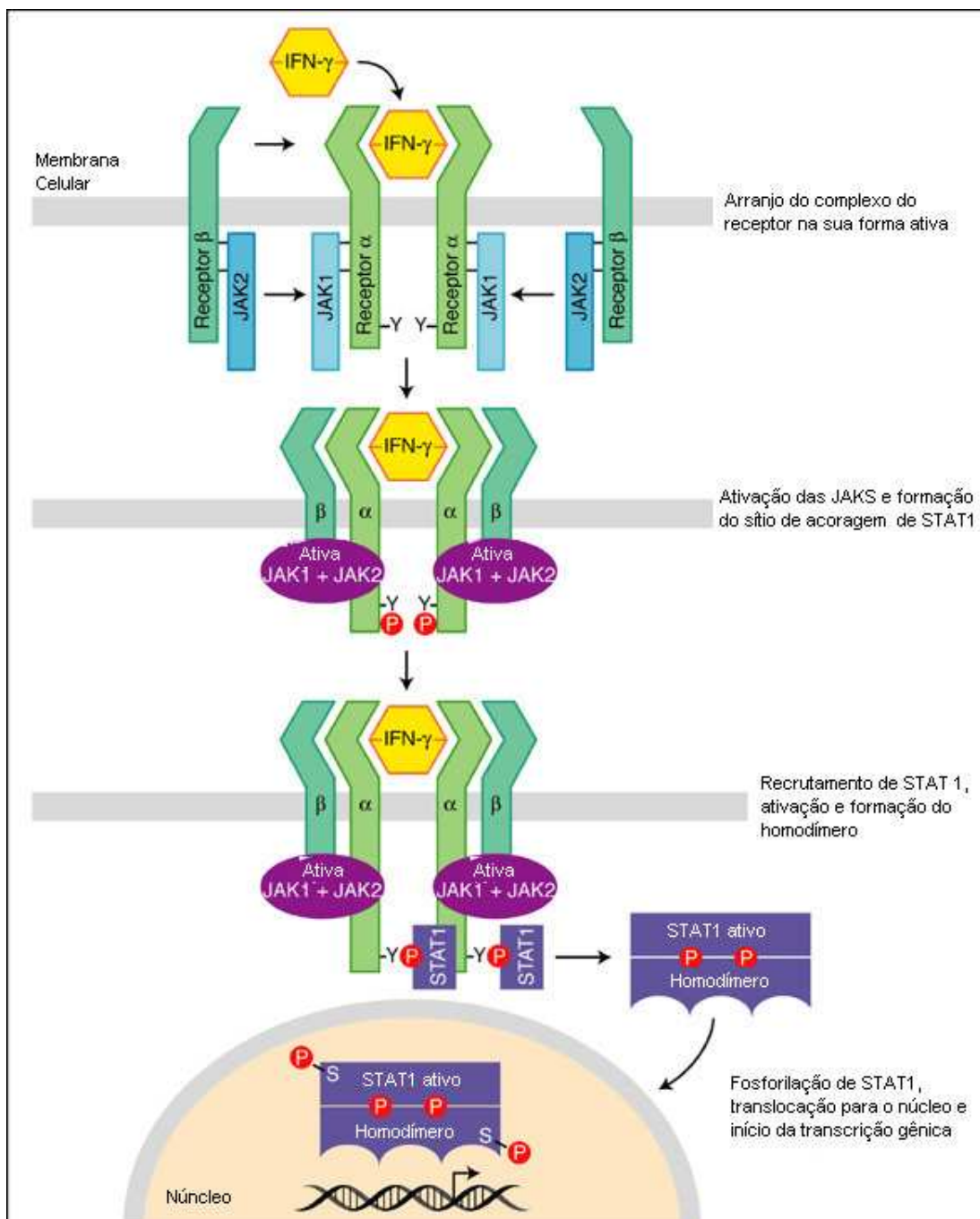


Figura 3: Representação esquemática da ativação do receptor de IFN- γ pelo seu ligante. Modificado da versão original publicado por *Cambridge Press* (2003).

Apesar da complexidade das respostas celulares ao estímulo com IFN- γ , parece razoável atribuí-las uma função de regulação do sistema imune e controle de doenças infecciosas. De fato, esta conclusão pode ser justificada pelo fenótipo de camundongos deficientes na expressão do próprio IFN- γ , da cadeia receptora IFNGR1 ou do principal fator de transcrição envolvido, STAT1. Nestes animais com prejuízos nas respostas celulares mediadas pelo IFN- γ , há uma marcante susceptibilidade a uma ampla variedade de agentes infecciosos (SUZUKI *et al.*, 1988; BUCHMEIR *et al.*, 1985; HUANG *et al.*, 1993; KAMIJO *et al.*, 1993; VAN DEN BROEK *et al.*, 1995; PEARL *et al.*, 2001). Além disso, estudos ao longo das últimas décadas têm demonstrado que a citocina em questão orquestra um amplo leque de programas celulares distintos. Dentre estes podemos destacar os seguintes: regulação da expressão de moléculas envolvidas nas vias de apresentação de antígenos, tanto de classe I quanto classe II; regulação do ciclo celular, crescimento celular e apoptose; transição da imunidade inata para a adaptativa, favorecendo a indução de respostas do tipo Th1; promoção da troca de isotipos na cadeia pesada das imunoglobulinas em linfócitos B; orquestramento do tráfico de leucócitos para sítios inflamatórios através do estímulo da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas; promoção da citotoxicidade celular mediada por anticorpo, pelo aumento da expressão do receptor de alta afinidade FC γ RI em células fagocíticas; aumento da fagocitose mediada por complemento, através da secreção acentuada dos fatores do complemento e da expressão elevada de receptores de complemento em fagócitos (revistos por SCHRODER *et al.*, 2004).

Também tem sido atribuída ao IFN- γ uma importante atividade anti-viral. Ainda que crucial na resposta celular imediata a uma infecção viral, as atividades imunomodulatórias desencadeadas pela citocina e citadas anteriormente são de extrema

importância em períodos mais tardios de infecção, promovendo uma resposta imune mais acurada e favorecendo a manutenção do estado anti-viral por um maior período de tempo (SCHRODER *et al.*, 2004). Dentre estes mecanismos anti-virais podemos destacar a indução de algumas enzimas chave, mais notavelmente PKR, uma cinase ativada por moléculas de RNA de fita-dupla, intermediários comuns durante o ciclo de replicação de RNA vírus (MEURS *et al.*, 1990; BERETTA *et al.*, 1996). A fosforilação de alguns substratos por esta enzima inibe a síntese de proteínas, tanto do hospedeiro, quanto virais, inibindo sua replicação (MEURS *et al.*, 1990). Além disso, os diversos efeitos pró-apoptóticos e inibidores de crescimento carregados pela ação do IFN- γ podem também participar no combate à replicação viral e à disseminação da infecção (SCHRODER *et al.*, 2004).

Um dos mais bem descritos efeitos do IFN- γ é a ativação das funções microbidas efectoras de macrófagos, células dendríticas (DCs) e neutrófilos. Os macrófagos ativados pela citocina apresentam maior capacidade de realizar pinocitose e fagocitose mediada por receptor. A atividade microbida desencadeada pelo IFN- γ inclui indução do sistema da NADPH-oxidase fagocítica, depleção de triptofano e aumento da expressão de enzimas lisossômicas (DECKER *et al.*, 2002).

De maneira mais importante, os fagócitos eliminam os agentes infecciosos pela geração de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (MACMICKING *et al.*, 1997). Dentre estas, o óxido nítrico (NO), um radical gasoso, solúvel tanto em água quanto em meios lipofílicos, reage com oxigênio na água e seus intermediários reativos para gerar outros radicais, ânions moderavelmente estáveis, anions muito estáveis, óxidos instáveis e peróxidos instáveis (MACMICKING *et al.*, 1997). O NO é produzido pela oxidação de uma molécula de L-arginina em um nitrogênio guanidino, originando N^o-OH-L-arginina como intermediário, o qual é novamente oxidado a uma molécula de NO e uma

de L-citrulina. Esta reação necessita de NADPH, de O_2 e gera $NADP^+$ e duas moléculas de água como produtos. A reação descrita acima é catalizada pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) que pode ser encontrada em três isoformas, chamadas NOS1 a NOS3. Apenas a isoforma NOS2, também chamada NOS induzida (iNOS) é expressa sob indução de citocinas e/ou estímulos microbianos. O NO formado nessa reação está em equilíbrio com as demais espécies reativas de nitrogênio (MACMICKING *et al.*, 1997).

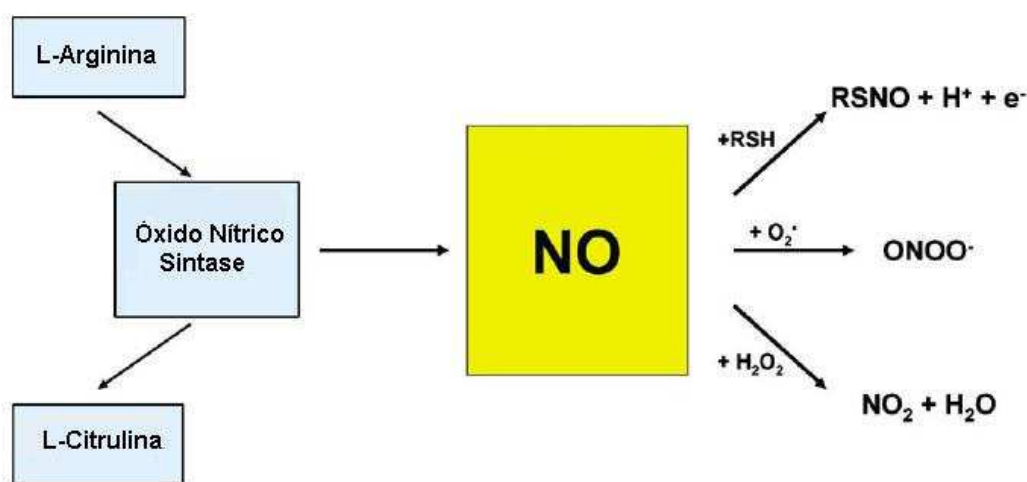


Figura 4: Representação esquemática da síntese no radical NO e da geração de outras espécies reativas de nitrogênio. A enzima NOS catalisa a conversão de L-arginina a NO e L-citrulina. Através de reações subseqüentes, o NO dá origem a outros metabólitos reativos. Modificado de Chesler *et al.*, 2002.

De modo interessante, o papel do IFN- γ como indutor da produção de ERN é evidente. A citocina induz a expressão da enzima argininasuccinato sintetase, geradora do substrato L-arginina (NUSSLER *et al.*, 1994; EIZIRIK *et al.*, 1996; KAWAHARA *et al.*, 2001), da enzima GTP-ciclohidroxilase, que produz o cofator tetrahydrobiopterina (BAEK *et al.*, 1993; DI SILVIO *et al.*, 1993), e da enzima iNOS (MACMICKING *et al.*, 1997). De fato, macrófagos de camundongos deficientes na expressão da citocina ou de seu receptor apresentam deficiência na expressão de iNOS. A expressão máxima desta enzima requer dois tipos diferentes de estímulos: um de

primagem, geralmente desempenhado pelo IFN- γ , e um de ativação, desencadeado por componentes microbianos ou por citocinas como o TNF- α (SCHRODER *et al.*, 2004).

Como revisto por MACMICKING *et al* (1997), uma gama de evidências atribui um papel fundamental para as ERN e a enzima iNOS na defesa do hospedeiro contra infecções. O NO possui atividade antimicrobiana, mesmo sendo proveniente de fontes exógenas. A produção de ERN dependente de IFN- γ é associada com aumento da capacidade de eliminação de patógenos ingeridos em células fagocíticas. Tal habilidade é inibida pela adição de inibidores de iNOS. Além disso, animais deficientes na expressão da enzima apresentam susceptibilidade acentuada a diversos modelos de infecções parasitárias.

A produção de ERN também é capaz de inibir a replicação de um amplo número de vírus. Tais agentes tiveram atividade virustática contra agentes de diversos táxons, tais quais, *poxviridae*, *herpetoviridae*, *rhabdoviridae*, *retroviridae*, entre outros (CROEN *et al.*, 1993; KARUPIAH *et al.*, 1993; MANINICK *et al.*, 1994; AKARID *et al.*, 1995; BI *et al.*, 1995). No entanto, os mecanismos antivirais ativados pelo NO são completamente desconhecidos, embora seja provavelmente bem distintos, dado o amplo leque de alvos moleculares possíveis. Interessantemente, trabalhos recentes demonstraram que o NO é capaz de reduzir a replicação do vírus da dengue *in vitro* (CHARNSILPA *et al.*, 2005; TAKHAMPUNYA *et al.*, 2006). A expressão de iNOS em monócitos do sangue periférico de paciente com FD foi correlacionada com a fase aguda tardia da doença e precedeu a eliminação do vírus da dengue dos monócitos nestes pacientes (NEVES-SOUZA *et al.*, 2005). Estes achados sugerem que a produção de NO por fagócitos ativados por IFN- γ pode ter papel importante na eliminação do vírus durante uma infecção. A superprodução de NO, no entanto, poderia levar a danos em células endoteliais, e anticorpos com reatividade cruzada contra o endotélio induzem

lesão numa maneira dependente do NO (LIN *et al.*, 2004). Desta forma, uma melhor caracterização do papel do NO, bem como da enzima iNOS, na patogênese do dengue, ainda é necessária. O papel desempenhado pelo IFN- γ no combate ao vírus (seja via a produção de NO, ou não) e na resposta do imune do hospedeiro frente à infecção também demandam maiores investigações.

2. OBJETIVOS

Considerando o impacto sanitário e sócio-econômico da infecção pelo vírus da dengue em nossa sociedade, o aparente envolvimento da resposta imune do hospedeiro no desencadeamento da doença, a escassez de conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pela patogênese da mesma e, particularmente, a observação, ainda que não conclusiva, do envolvimento da citocina IFN- γ e do NO durante a resposta ao vírus, temos como objetivo avaliar o papel desempenhado por estas duas moléculas na resposta do hospedeiro à infecção. De maneira mais específica, buscamos responder as seguintes perguntas:

Há produção de IFN- γ *in vivo* neste modelo de infecção pelo vírus da dengue?

A ausência da produção do IFN- γ durante a infecção acarretaria em maior susceptibilidade à infecção?

Qual o papel desta molécula na resposta inflamatória característica da infecção em questão?

O IFN- γ estaria envolvido no controle da replicação viral durante a infecção pelo vírus da dengue?

Os mecanismos de resposta do hospedeiro desencadeados pelo IFN- γ durante a resposta à infecção envolveriam a ativação da síntese de óxido nítrico?

A ausência da expressão da enzima iNOS durante a infecção acarretaria em maior susceptibilidade à infecção?

Qual o papel da enzima iNOS na resposta inflamatória desencadeada pela infecção do vírus da dengue?

A enzima iNOS estaria envolvida no controle da replicação viral durante a infecção pelo vírus da dengue?

3. ESTRATÉZIA EXPERIMENTAL

Para responder as perguntas acima, utilizamos o modelo animal de infecção pelo vírus da dengue. Este modelo é baseado na injeção de um isolado clínico do vírus de Dengue adaptado ao hospedeiro murino. O modelo em questão apresenta as características necessárias para o acompanhamento de alterações hematológicas, sinais clínicos e respostas fisiológicas semelhantes àsquelas encontradas na infecção humana.

Para avaliar o papel das moléculas mencionadas na patogênese do dengue, animais geneticamente deficientes na expressão da citocina IFN- γ ou animais geneticamente deficientes na expressão da enzima iNOS, produtora do NO, foram utilizados. A avaliação do curso da infecção, bem como das alterações induzidas por esta, nos animais em questão, em comparação àquela encontrado em animais selvagens, permitiu a inferência do papel desempenhado por estas moléculas durante a infecção pelo vírus da dengue.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Vírus

Neste projeto foi utilizado o sorotipo 2 (DEN 2). O vírus foi isolado de amostra clínica pelo Dr. George Ignatyev do Vector Institute da Rússia e depositado no banco de dados do *Gene Bank* sob o número de acesso AY927231.

Para um aumento da virulência dos isolados no hospedeiro murino, o vírus foi injetado intracerebralmente em camundongos. No quinto dia após a infecção, os cérebros foram retirados destes animais, foi feito um homogenato e, novamente, injetado intracerebralmente em outro animal. Várias passagens foram realizadas como descrito anteriormente (ATRASHEUSKAYA *et al.*, 2003).

4.2 Titulação do vírus da Dengue

Células LLC- MK2 foram crescidas em meio DMEM com 5% de SFB, sendo implantadas em placa de seis poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço. 450 μ L de uma série de diluições seriadas contendo o vírus a ser titulado foram inoculados em células com monocamadas recém fechadas, sendo que como controle foi utilizado um poço com células não infectadas. Após uma hora de incubação do inóculo, o meio foi desprezado, e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato (“*phosphate-buffered saline – PBS*”) (3.2 mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl). Em seguida, foi adicionado meio DMEM contendo 1.5% de carboximetilcelulose e as placas incubadas a 37°C por 7 dias. As placas foram coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta em PBS para a determinação do título das amostras, as quais foram expressos em PFU/mL (unidades formadoras de placas por mililitro).

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6j (8 semanas; selvagens – WT e deficientes na expressão de IFN- γ - IFN- $\gamma^{-/-}$ - ou da enzima iNOS - iNOS $^{-/-}$). Os animais foram infectados intraperitonealmente com o sorotipo 2 do dengue (10PFU/100 μ L/animal) e mantidos em micro-isoladores com livre acesso a água e ração. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética animal da UFMG. Os animais foram monitorados em intervalos de tempos indicados para a obtenção das curvas de letalidade ou então, sacrificados no 3º, 5º e 7º dia após a infecção para análise dos parâmetros inflamatórios.

4.4 Determinação dos níveis de citocinas

Para dosagem de citocinas, fragmentos de pulmão, baço ou fígado, foram homogeneizados em PBS contendo inibidor de proteases (0,1 mM “phenylmethanesulfonyl fluoride”, 0,1 mM “benzethonium chloride”, 10 mM “EDTA” e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% “Tween 20”, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). O sobrenadante foi usado para as dosagens, após centrifugação de 3.000 g durante 10 minutos à 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). O soro foi obtido do sangue total (15 min à 37° C seguidos de 30 min à 4° C) por centrifugação a 3000g por 10 minutos e posteriormente armazenado à -20° C até análise posterior.

As amostras de soro, pulmão, de baço e de sobrenadante de cultura foram analisadas na diluição 1:3 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina, ao passo que as amostras de fígado foram analisadas na diluição 1:5.

Os níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-6, CXCL1 (KC), e CCL2 (MCP-1) foram medidos no soro, baço, fígado e pulmão dos animais de acordo com descrição feita em publicações de Souza et al. (2000 a , b) 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 ocorre durante 18 horas à 4° C. A reação é bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma). A reação é detectada pela incubação com um anticorpo de detecção, conjugado à biotina, por 2 horas, à temperatura ambiente, seguido de incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (“HRP-Streptavidin Pharmingen” - 1:4000). A revelação é feita com “OPD (*o*-phenylenediamine dihydrochloride” - Sigma). Após 30 minutos a reação é interrompida com H₂SO₄.

A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm. Os ensaios têm uma sensibilidade de 8-16 pg/ml.

4.5 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi obtida pelos ensaios de atividade da mieloperoxidase como descrito anteriormente (MATOS et al., 1999).

Sumariamente, fragmentos de tecido dos animais infectados ou controles foram removidos e congelados a -20°C. Após o descongelamento, o tecido (1 g de tecido em 19 mL de tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador de tecidos (Power Gen

125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA), centrifugado a 3000g por 15 minutos (Centrífuga. BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e o precipitado é submetido à lise hipotônica (15 mL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 s após).

Após nova centrifugação o precipitado foi ressuspenso em tampão NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de “*hexadecyltrimethylammonium* (HTAB)” 0,5% e re-homogeneizado. Aliquotas 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 à 3000 g e foi recolhido o sobrenadante. As amostras dos tecidos foram diluídas previamente à análise em tampão NaPO₄ 0,05 M na razão 1:10.

A atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuspenso foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) à 450 nm utilizando “*tetramethylbenzidine*” (1,6 mM) e H₂O₂ (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 pelo processamento de neutrófilos purificados (> 95% pureza) como descrito acima e utilizado para a medida de atividade da mieloperoxidase.

4.6 Quantificação dos níveis de plaquetas circulantes

No momento do sacrifício dos animais, 180µL de sangue foram coletados e armazenados em microtubos (Eppendorf do Brasil, São Paulo, Brasil) de 2mL contendo 20µL de uma solução de EDTA em PBS a 10%. As amostras foram levadas para quantificação de plaquetas em um laboratório de análises clínicas, através do método de impedância eletrônica, utilizando-se um aparelho Coulter Counter S-Plus JR (Beckman Coulter Inc, Fullerton, USA).

4.7 Análise do índice de hematócrito

Uma pequena amostra de sangue de cada animal foi retirada por meio de um tubo capilar de vidro heparinizado, o qual foi centrifugado em uma centrífuga de microhematócrito (Fanem, São Paulo, Brasil) (rotação por 10 mim). Depois disso, foi feita 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 será a concentração de hemácias no sangue.

4.8 Teste de hipernocicepção

Os experimentos foram realizados utilizando um analgesímetro digital (Insight Equipamentos, São Paulo, Brazil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas. O contato do transdutor de pressão à pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com

aproximadamente 4,0 mm de diâmetro adaptada a esse. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, com dimensões de 12x20x17 cm cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais. Por entre as malhas da rede, foi aplicada uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar 3 medidas similares com uma clara resposta de “*flinch*” após a retirada da pata. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a média das forças obtidas, em gramas, antes do procedimento experimental (dia zero) bem como durante 5 dias após a infecção com o vírus da dengue. Os testes hipernociceptivos foram realizados entre 08:00 e 16:00 h. Todos os experimentos seguiram as normas e éticas estabelecidas para experimentação com animais conscientes, recomendadas pelo IASP (International Association for the Study of Pain) (ZIMMERMANN, 1983).

4.9 Cultura e estimulação in vitro de células dendríticas derivadas da medula óssea para quantificação de citocinas e quimiocinas e Óxido Nítrico

Para obtenção das células de medula, a medula óssea do fêmur foi extraída pela lavagem com 2mL de PBS. Após contagem em câmara de Neubauer, as células foram diluídas para a concentração de 2×10^6 células/mL e cultivadas em placas de Petri contendo 10mL de meio apropriado para diferenciação em DCs (DMEM suplementado com HEPES 25mM, aminas essenciais MEM 1x, piruvato de sódio MEM, Gentamicina 40µg/mL, β-mercaptoetanol 50µM, L-Glutamina 10mM, vitaminas MEM 1x, Penicilina

100U/mL, Estreptomicina 100U/mL, Asparagina 250µg/mL, Soro fetal bovino 10% v.v. – todos da Cultilab, Campinas, Brasil - e sobrenadante de células J558L 5% v.v. – gentilmente cedido pelo Prof. Bernhard Ryffel) a 37°C numa atmosfera contendo 5% de CO₂. No terceiro dia de cultura, mais 10 mL de meio fresco foi adicionado, bem como mais 500µL do sobrenadante da cultura de células J558L. No sexto dia de cultura, o sobrenadante da cultura foi recuperado e submetido à centrifugação a 140 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 10 mL do meio para DCs e suplementado com 500mL de sobrenadante de células J558L. Este volume foi devolvido à placa de cultura e mantido a 37°C a 5% de CO₂ até o 8º dia, quando estes passos foram repetidos. Finalmente, no 10º dia de cultivo, as células foram liberadas das placas de Petri pela lavagem com meio de cultura e centrifugadas a 140 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 1mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) completo. Após contagem em câmara de Neubauer, as células foram diluídas para a concentração de 10⁵ células/100µL e dispostas em placas de 96 poços. Após 4 horas de cultivo a 37°C numa atmosfera contendo 5% de CO₂, os estímulos foram adicionados. Para a infecção *in vitro* (Centrífuga. BR4, Jouan, Winchester, VA, USA). O sobrenadante foi recolhido e as células foram ressuscitadas em 50 µL de uma suspensão contendo o vírus da Dengue em PBS, na proporção de 2 PFU por célula. Após duas horas de incubação do inóculo, as placas contendo DCs foram novamente centrifugadas a 130 g por 5 minutos e o meio foi desprezado. Em seguida, foi adicionado meio RPMI 1640 contendo 10% soro fetal bovino e as placas foram incubadas a 37°C numa atmosfera contendo 5% de CO₂. Como controle positivo, foi utilizado o estímulo com Lipopolissacarídeo (SIGMA, EUA) na concentração final de 50 ng/ml. Após 24, 48 e 72 horas de cultivo, as placas contendo

DCs foram centrifugadas a 130 g por 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido para a quantificação de nitrito pelo método de Griess e de citocinas, pelo método de ELISA.

4.10 Ensaio de viabilidade de células em cultura utilizando o método do MTT

Após a coleta do sobrenadante, as DCs em cultivo foram submetidas a um ensaio de viabilidade para avaliar qualquer toxicidade induzida pelos distintos tratamentos e estímulos. Para isto, as células foram cultivadas na presença de 200µL de uma solução de MTT (Calbiochem, Londres, Reino Unido) a 500µg/mL em meio completo a 37°C numa atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 4 horas de incubação, as placas contendo DCs foram centrifugadas a 130 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram, então, lisadas pela lavagem com uma solução de SDS (SIGMA, USA) a 10% em dimetilformamida (VETEC, São Paulo, Brasil)/água (1:1). 100µL do lavado foi transferido para uma placa de ELISA e a densidade óptica foi avaliada no comprimento de onda de 550nm. Os valores obtidos são expressos como porcentagem da absorbância média do grupo controle, cultivado na presença de meio, apenas.

4.11 Quantificação de nitrito pelo método de Griess

O nitrito é um produto primário da oxidação do NO e, portanto, a concentração de nitrito no sobrenadante de cultura foi utilizada como índice da produção de NO. A dosagem de nitrito total no sobrenadante foi realizada pela adição de 50µL de reagente de Griess (4% sulfanilamida e 0,2% naftilenediamida em ácido fosfórico 10% - todos SIGMA, USA) a uma amostra de 100µL de sobrenadante de cultura. Após um intervalo de cerca de 3 minutos para que se ocorra a reação, a densidade óptica a 550nm foi obtida utilizando um leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do

Brasil). A concentração total de nitrito foi calculada pela comparação com a densidade ótica a 550nm de uma curva padrão de nitrito de sódio preparado em meio RPMI 1640, composta de soluções nas seguintes concentrações: 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,5 μ M, 3,25 μ M e 1,75 μ M.

4.12 Análise estatística

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

4.13 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: “*IFN-gamma, Nitric Oxide, iNOS, Dengue, infection,*

inflammation, systemic inflammatory response syndrome, neutrophil(s), TNF-alpha, cytokine(s), chemokine(s)”.

5. RESULTADOS

Há produção de IFN- γ in vivo neste modelo de infecção pelo vírus da dengue?

5.1 Cinética da produção de IFN- γ após infecção com o vírus da dengue.

Para averiguar se a produção da citocina IFN- γ é induzida após a infecção de camundongos com o vírus da dengue, bem como onde e quando esta citocina é produzida, a dosagem da mesma foi feita no lisado de vários tecidos de animais infectados no terceiro, quinto e sétimo dias após a infecção. Como pode ser observada na figura 5, a produção do IFN- γ já está aumentada no fígado dos camundongos infectados a partir do 3º dia de infecção. Neste órgão, os níveis da citocina se mantêm elevados no 5º e 7º dias após a infecção (Figura 5A). Já no baço, a produção de IFN- γ se iniciou 5 dias após a infecção, sendo que houve uma maior liberação da citocina no 7º dia (Figura 5B). Este padrão foi refletido pela produção sistêmica da citocina, como acessado pelas concentrações séricas (Figura 5C). Assim, tanto no baço quanto no soro, níveis aumentados de IFN- γ foram encontrados em camundongos apenas 5 dias decorridos da infecção e estes níveis foram ainda maiores no 7º dia (Figuras 5 B e C). Estes achados sugerem a participação do IFN- γ na resposta do hospedeiro à infecção pelo vírus da dengue.

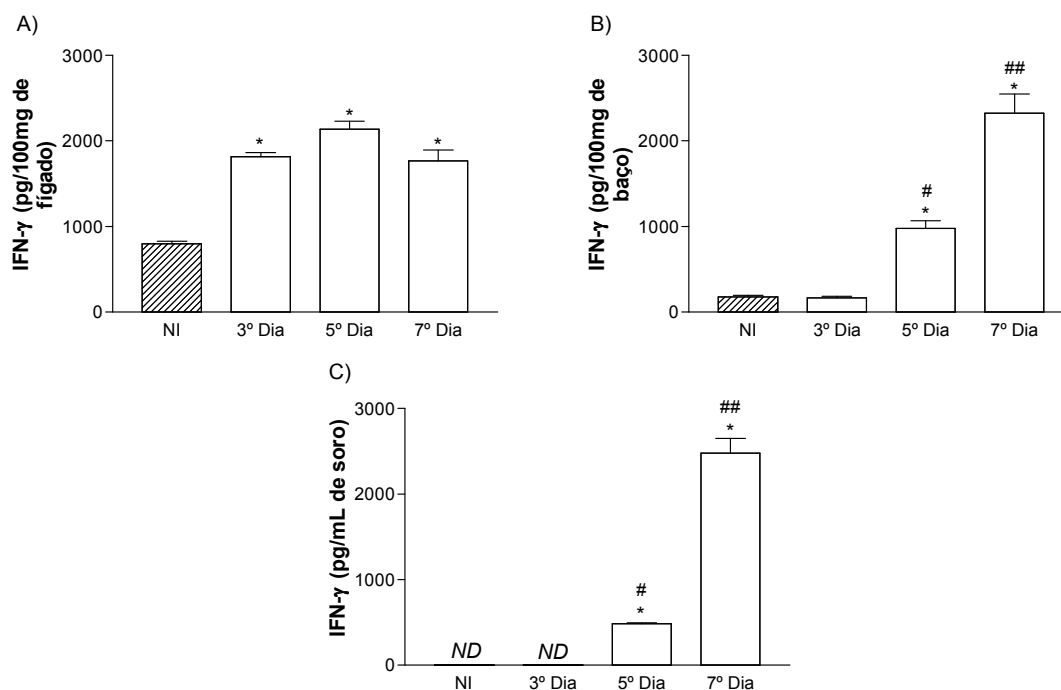


Figura 5: Cinética da liberação da citocina IFN- γ em animais selvagens infectados com o vírus da dengue. As concentrações de IFN- γ foram quantificadas por ELISA específico no fígado (A), baço (B) e soro (C). Os animais foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 10PFU/100 μ L em PBS. Resultados são apresentados como pg de IFN- γ por 100 mg de tecido ou pg de IFN- γ por mL de soro e são média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. *ND* para concentrações não detectáveis da citocina; * para $P < 0,05$ quando comparado com animais não infectados (NI); # para $P < 0,05$ quando comparados com animais do grupo 3^o dia; ## para $p < 0,05$ quando comparados com animais do grupo 5^o dia.

A ausência da produção do IFN- γ durante a infecção acarretaria em maior susceptibilidade à infecção?

5.2 Camundongos deficientes na expressão de IFN- γ apresentaram elevada taxa de letalidade após infecção com o vírus da dengue.

Para averiguar qual o papel do IFN- γ durante a infecção em questão, animais geneticamente deficientes na produção da citocina (IFN- $\gamma^{-/-}$) e seus controles selvagens

(WT) foram infectados com 10PFU ou 1PFU do vírus e monitorados quanto à taxa de sobrevivência (Figura 6). Ao passo que 100% dos animais WT infectados com 1PFU estavam vivos após 14 dias da infecção, apenas 15% dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ resistiram à infecção com 1PFU. De modo interessante, todas as mortes entre os animais IFN- $\gamma^{-/-}$ ocorreram antes do 8º dia de infecção. Mantendo o mesmo padrão, todos os animais IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados com 10PFU do vírus sucumbiram antes do 8º dia de infecção, sendo que 90% dos animais WT sobreviveram por mais de 14 dias (Figura 6). Uma vez que, ao acompanharmos a letalidade, o inóculo de 10PFU apresentou grande diferença estatística entre os grupos IFN- $\gamma^{-/-}$ e WT e que experimentos realizados previamente demonstravam que esse inóculo era capaz de induzir várias alterações características do dengue, todos os experimentos seguintes foram feitos utilizando-se desse inóculo.

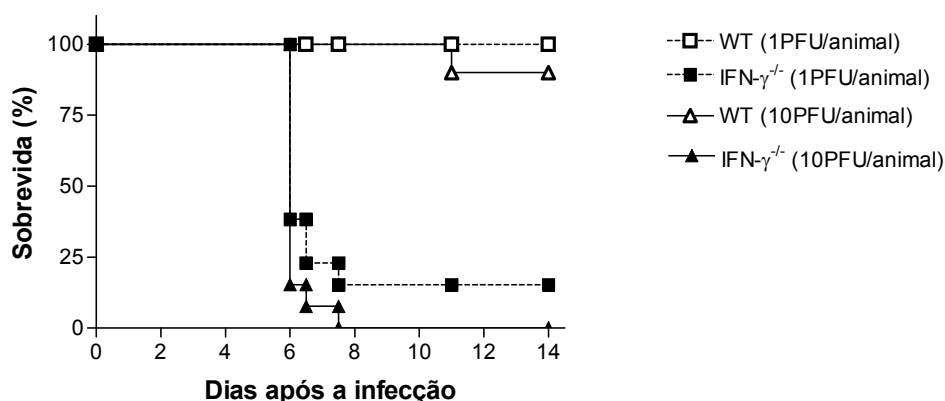


Figura 6: Letalidade induzida pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens. Camundongos selvagens (WT) ou deficientes na expressão de IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 1 ou 10PFU/100 μ L em PBS. Os grupos foram de 7-8 animais. A sobrevivência dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados com os inóculos de 1 e 10PFU foi estatisticamente diferente ($P < 0,05$) em relação aos grupos de animais WT infectados com 1 e 10PFU, respectivamente.

5.3 Animais deficientes na expressão de IFN- γ apresentaram alterações hematológicas e resposta hipernociceptiva exacerbadas após infecção com o vírus da dengue.

Dentre as alterações observadas durante o curso de uma infecção pelo vírus da dengue, estão alterações hematológicas tais como aumento do hematócrito e plaquetopenia e a ocorrência de dor (RIGAU-PÉREZ, 2006).

Deste modo, a ocorrência destas alterações foram examinadas em animais IFN- $\gamma^{-/-}$ em comparação a animais WT. Os animais WT apresentaram plaquetopenia já no terceiro dia, sendo que esta permaneceu aumentada no 5º dia de infecção. Entretanto, animais IFN- $\gamma^{-/-}$ apresentaram plaquetopenia ainda mais acentuada no 3º e 5º dia de infecção, quando comparados com os animais selvagens (Figura 7A). Porém, quando avaliamos a hemoconcentração, verificamos que apenas após 5 dias de infecção houve aumento do nível de hematócrito induzido pelo vírus da dengue em animais WT. Na ausência da produção de IFN- γ , essa hemoconcentração foi ainda mais acentuada (Figura 7B).

Outro importante sinal do modelo é a observação de resposta hipernociceptiva nos animais infectados. Essa interpretação de dor foi verificada a partir do terceiro dia de infecção nos animais selvagens (Figura 7C). Entretanto, foi observada uma antecipação desta resposta comportamental nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados logo no primeiro dia após a infecção. Além disso, até o terceiro dia de infecção, camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ mantiveram uma maior resposta em relação aos animais WT. Nos dias 4 e 5 após a infecção, ambos os grupos apresentaram hipernocicepção em relação ao grupo não infectado, porém sem diferença significativa entre os dois grupos infectados.

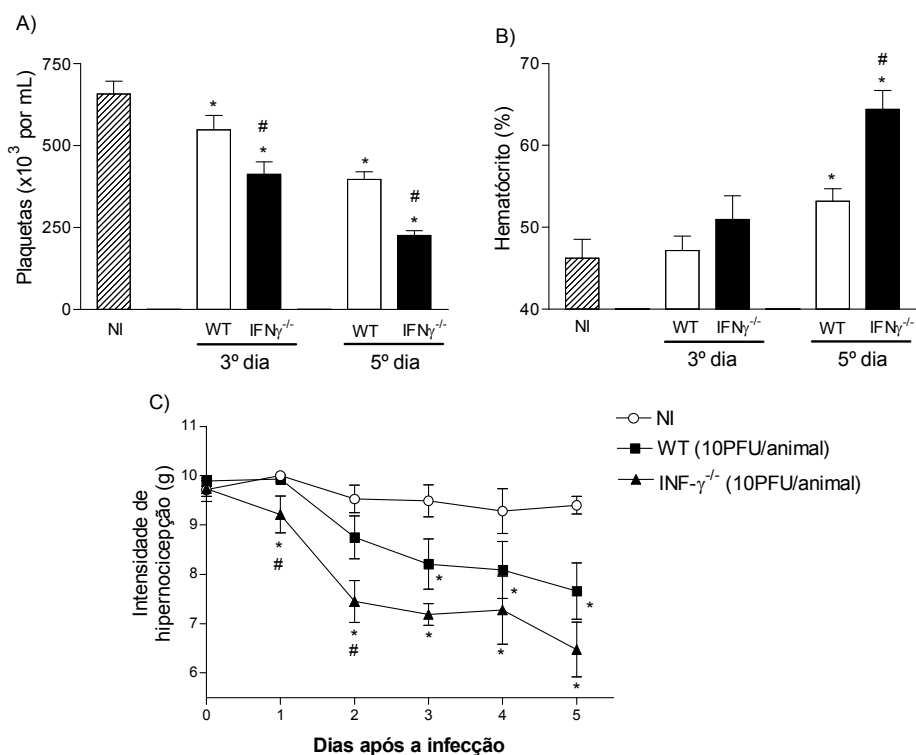


Figura 7: Alterações hematológicas e hipernociceptiva desencadeadas pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- $\gamma^{-/-}$ comparados com animais selvagens. Camundongos selvagens (WT) ou deficientes na expressão de IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 10PFU/100 μ L em PBS. As plaquetas (A) foram quantificadas em amostra de sangue heparinizado pelo método de impedância eletrônica. O hematócrito (B) foi medido pela relação percentual entre a porção celular e a amostra total de sangue coletada em um tubo capilar após centrifugação. A intensidade de hipernociceção (C) foi obtida utilizando um analgesímetro digital. Os resultados foram expressos em número de plaquetas por mL de sangue ou em porcentagem, ou em gramas e são média \pm EPM de 4-5 animais por grupo. * para $P < 0,05$ quando comparado com animais não infectados (NI); # para $P < 0,05$ quando comparados com animais selvagens.

5.4 Animais deficientes na expressão de IFN- γ apresentaram níveis elevados de TNF- α e IL-6 após infecção com o vírus da dengue.

Diversos trabalhos têm demonstrado o aumento dos níveis circulantes das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 em pacientes infectados com o vírus da

dengue (CHATURVEDI *et al.*, 2000). Além disso, modelos animais suportam a participação de citocinas, especialmente do TNF- α na patogênese da doença (ATRASHEUSKAYA *et al.*, 2003; SHRESTA *et al.*, 2006). Desta forma, os níveis de TNF- α e IL-6 foram medidos no decorrer da infecção em animais IFN- $\gamma^{-/-}$ ou WT. A Figura 8 demonstra que, no 3º ou 5º dia após infecção, não houve liberação detectável da concentração sérica de TNF- α em animais WT (Figura 8 A), entretanto houve um aumento significativo dessa citocina no fígado ou baço após infecção (Figuras 8 A, B). De maneira interessante, em animais IFN- $\gamma^{-/-}$, houve um aumento sistêmico da concentração de TNF- α no 5º dia (Figura 8 A), e uma exacerbação da liberação da mesma nos demais órgãos analisados quando comparados com os animais WT (Figuras 8 B, C). Após 5 dias de infecção, animais WT apresentaram um aumento significativo na liberação de IL-6 no soro (Figura 8D), fígado (Figura 8E), e baço (Figura 8F) o que não foi verificado no 3º dia após o inoculo. O perfil de produção de IL-6 em animais IFN- $\gamma^{-/-}$ foi muito distinto ao encontrado para TNF- α . Houve um aumento significativo da concentração de IL-6 no soro de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ quando comparados a animais WT (Figura 8D). Em contrapartida os animais IFN- $\gamma^{-/-}$ apresentaram uma menor concentração dessa citocina no fígado (Figura 8E), e baço (Figura 8F) quando comparados aos animais selvagens.

Estes resultados demonstram que animais IFN- $\gamma^{-/-}$ apresentam uma infecção de caráter mais grave, associada com manifestações hematológicas acentuadas, intensa resposta hipernociceptiva, alteração no perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias e maior taxa de letalidade. Desta forma, a ausência da produção do IFN- γ durante a infecção acarretaria em maior susceptibilidade à infecção.

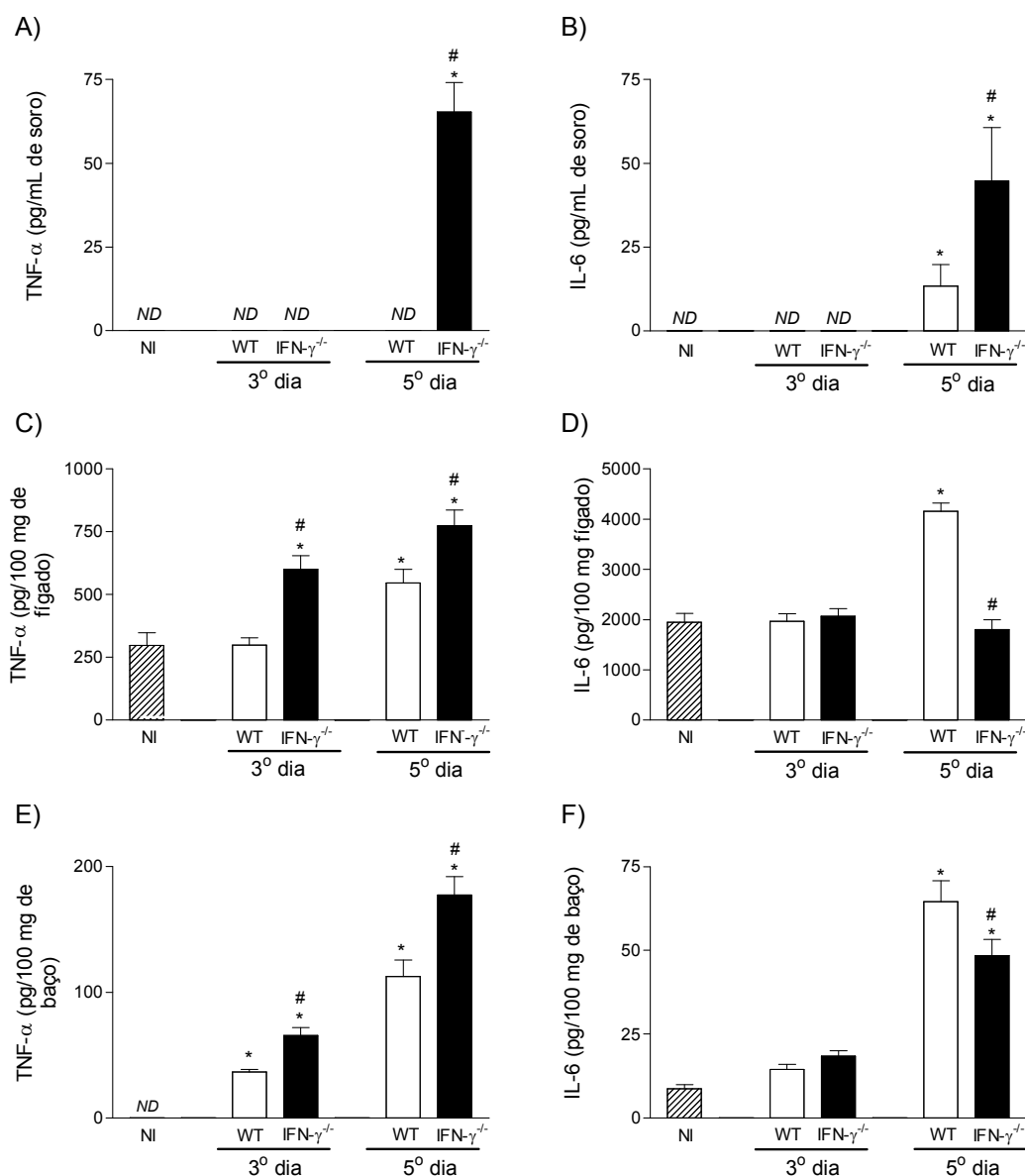


Figura 8: Liberação das citocinas TNF- α e IL-6 desencadeada pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens. TNF- α e IL-6 foram quantificadas por ELISA específico no soro (A, D), fígado (B, E) e baço (C, F) dos animais. Camundongos selvagens (WT) ou deficientes na expressão de IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 10PFU/100 μ L em PBS, anestesiados e sacrificados para coleta dos tecidos citados no tempo indicado. Resultados são apresentados como pg de TNF- α ou IL-6 por 100 mg de tecido ou pg de TNF- α ou IL-6 por mL de soro e são média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. *ND* para concentrações não detectáveis da citocina; * para $P < 0,05$ quando comparado com animais não infectados (NI); # para $P < 0,05$ quando comparados com animais selvagens.

Qual o papel desta molécula na resposta inflamatória característica da infecção em questão?

5.5 Animais deficientes na expressão de IFN- γ apresentaram maior influxo de neutrófilos para o pulmão.

A elevada produção de TNF- α e IL-6 é característica das patologias que envolvem a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (HALSTEAD, 2003; ROTHMAN, 2003; SOMMERS, 2003). O envolvimento de neutrófilos nessas patologias é bem demonstrado, de modo que buscamos averiguar o influxo de neutrófilos para o tecido pulmonar após a infecção com o vírus da dengue. Houve um aumento do influxo de neutrófilos no pulmão de animais WT no 3º e 5º dia de infecção (Figura 9A). No entanto, animais IFN- $\gamma^{-/-}$ apresentaram um aumento vertiginoso do número destas células para o tecido pulmonar, tanto no 3º, quanto no 5º dia de infecção (Figura 9A). Este padrão de maior influxo neutrofílico foi correlacionado com os níveis da quimiocina CXCL1 no tecido. Esta quimiocina é um importante agente no recrutamento de neutrófilos para um sítio inflamatório (CHARO *et al.*, 2006). Deste modo, já no 3º dia, houve um aumento dos níveis de CXCL1 no pulmão de animais WT, sendo que esse aumento se manteve no 5º dia pós infecção (Figura 9B). Nos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$, os níveis da quimiocina foram ainda mais elevados, tanto no 3º quanto no 5º dia após a infecção.

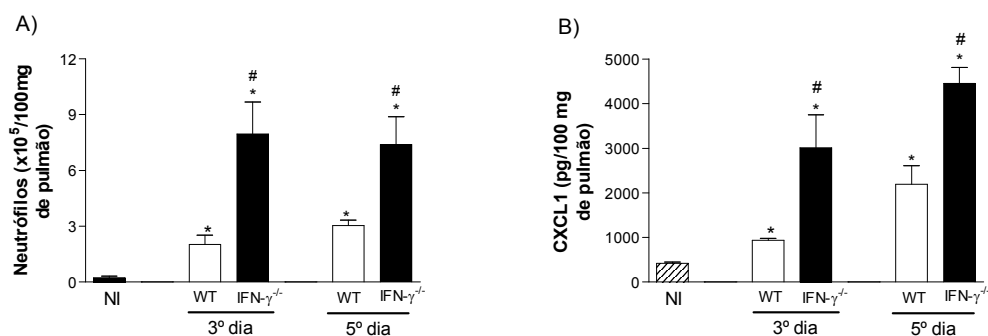


Figura 9: Influxo de neutrófilos e liberação de CXCL1 no pulmão após infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens. A migração de neutrófilos (A) foi avaliada pela quantificação dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO). CXCL1 (B) foi quantificada por ELISA específico no homogenato pulmonar. Os animais foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 10PFU/100 μ L em PBS, anestesiados e sacrificados para coleta dos tecidos citados no tempo indicado. Resultados são apresentados como número de neutrófilos por 100 mg de tecido ou pg de CXCL1 por 100 mg de pulmão e são média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. * para $P < 0,05$ quando comparado com animais selvagens.

5.6 A produção de quimiocinas esteve reduzida em animais deficientes na expressão de IFN- γ infectados com o vírus da dengue.

As quimiocinas são importantes mediadores do tráfico celular seja em processo homeostáticos, seja em eventos inflamatórios (ABBAS & LICHTMAN, 2005; CHARO *et al.*, 2006). Deste modo, procedemos à dosagem das quimiocinas CXCL1 e CCL2 nos tecidos dos animais infectados. Vale ressaltar que as duas quimiocinas tem sido associadas com à infecção humana pelo vírus da dengue (CHATURVEDI *et al.*, 2000; CLYDE *et al.*, 2006). A quimiocina CCL2 não foi detectada no fígado de animais WT, entretanto 3 dias após a infecção houve uma produção detectável dessa quimiocina no fígado com aumento ainda mais acentuado no 5º dia de infecção (Figura 10A) . No entanto, animais IFN- $\gamma^{-/-}$ apresentaram um aumento da liberação dessa quimiocina no 3º

dia, porém sem acentuação desse aumento no 5º dia de infecção (Figura 10A). A quimiocina CXCL1 apresentou um aumento significativo após 5 dias de infecção (Figura 10B). Entretanto, os animais IFN- $\gamma^{-/-}$ não apresentaram alterações significativas na produção dessa quimiocina (Figura 10B). Embora em contraste com aqueles encontrados no pulmão, estes dados parecem apontar para uma capacidade reduzida, por parte dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$, em produzir quimiocinas frente à infecção pelo vírus da dengue.

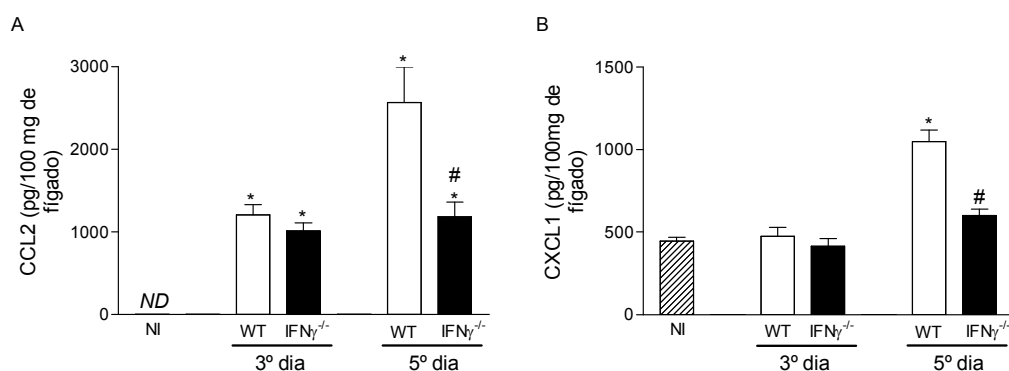


Figura 10: Liberação das quimiocinas CCL2 e CXCL1 desencadeada pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens. CCL2 (A) e CXCL1 (B) foram quantificadas por ELISA específico no homogenato dos animais. Camundongos selvagens (WT) ou deficientes na expressão de IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 10PFU/100 μ L em PBS, anestesiados e sacrificados para coleta dos tecidos citados no tempo indicado. Resultados são apresentados como pg de CCL2 ou CXCL1 por 100 mg de tecido e são média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. ND para concentrações não detectáveis da citocina; * para $P < 0,05$ quando comparado com animais não infectados (NI); # para $P < 0,05$ quando comparados com animais selvagens.

O IFN- γ estaria envolvido no controle da replicação viral durante a infecção pelo vírus da dengue?

5.7 Animais deficientes na expressão de IFN- γ apresentaram carga viral elevada após infecção com o vírus da dengue.

Os resultados anteriores apontaram para uma maior susceptibilidade por parte dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ frente à infecção com o vírus da dengue. Além disso, alguns estudos têm sugerido que a citocina em questão apresentaria um importante papel no controle da replicação do vírus da dengue (CLYDE *et al.*, 2006). Desta forma, buscamos averiguar se a maior susceptibilidade dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ à infecção estava associada a incapacidade de combate à replicação viral. De fato, a carga viral presente no baço de animais IFN- $\gamma^{-/-}$ após 5 dias de infecção foi cerca de 1,5 logaritmo maior que àquela presente no mesmo tecido de animais WT (Figura 11). Assim, pode-se concluir que há um prejuízo no combate à replicação viral na ausência da produção de IFN- γ .

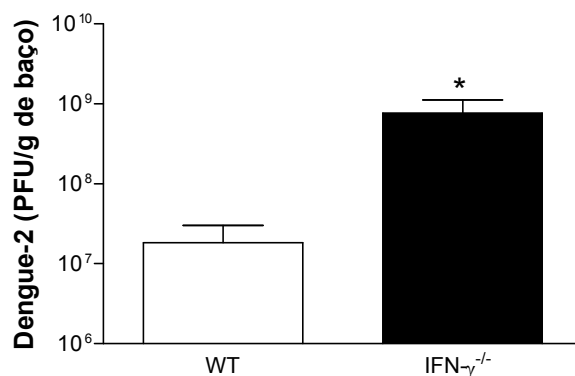


Figura 11: Quantificação de unidades formadoras de placas (PFU) após a infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de IFN- γ comparados com animais selvagens. A quantificação do título viral foi obtida por ensaio de titulação usando células permissivas à infecção pelo vírus da dengue. Camundongos selvagens (WT) ou deficientes na expressão de IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}) foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 10PFU/100 μ L em PBS, anestesiados e sacrificados para coleta do baço no quinto dia de infecção. Resultados são apresentados como PFU por mg de tecido e são média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. * para $P < 0,05$ quando comparado com animais selvagens.

Os mecanismos de resposta do hospedeiro desencadeados pelo IFN- γ durante a resposta à infecção envolveriam a ativação da síntese de óxido nítrico?

5.8 Células Dendríticas precisaram do estímulo com IFN- γ para manterem uma produção contínua de NO após infecção com o vírus da dengue.

As células dendríticas (DCs) parecem ser os principais alvos para infecção pelo vírus da dengue (CLYDE *et al.*, 2006). Além disso, estas células são de extrema importância para estímulo da imunidade adaptativa, dado o seu importante papel como células apresentadoras de antígenos e promotoras de sinais para ativação de linfócitos (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Assim, para avaliar a resposta dessas células à

infecção com o vírus da dengue, realizamos a infecção *in vitro* de DCs. Logo após 24 horas de infecção com o vírus da dengue, as DCs foram capazes de liberar níveis elevados de NO (Figura 12A). Esta produção não foi alterada pela presença de IFN- γ no meio de cultura durante as primeiras 24 horas. No entanto, decorridas 48 horas e até mesmo 72 horas da infecção, a produção de NO por parte das DCs cessou (Figura 12A). Esse dado não ocorreu devido à redução na viabilidade celular, visto que não houve alteração do número de células no decorrer da cultura (Figura 12B). Logo, para que as DCs continuem a produzir NO na presença do vírus, é necessário o estímulo com IFN- γ . Estes dados sugerem que uma resposta microbicida duradoura por parte das DCs necessita da ativação desencadeada pelo IFN- γ .

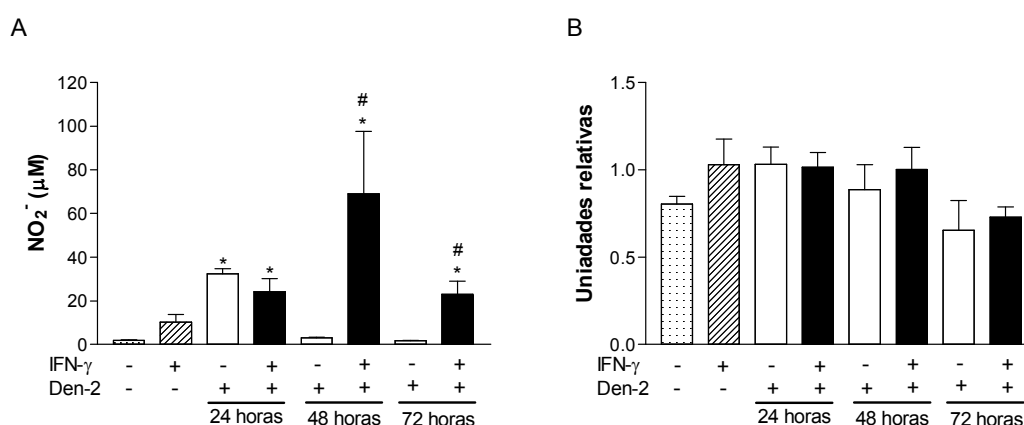


Figura 12: Produção de óxido nítrico por células dendríticas após a infecção com o vírus Dengue-2. Após diferenciação à partir de células da medula óssea, as células dendríticas foram infectadas com 0.2 PFU do vírus Dengue-2 por célula, e estimuladas ou não com IFN- γ recombinante murino (50UI/mL). Após decorridas 24, 48 e 72 horas de incubação, o sobrenadante foi recolhido para quantificação do NO e as células foram submetidas a ensaio de viabilidade. A dosagem do nitrato foi feito pelo método de Griess e o ensaio de viabilidade foi feito pelo método do MTT. Resultados foram apresentados como a concentração de nitrito em mM e como unidades relativas e são média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. * para $P < 0,05$ quando comparado com grupo tratado com meio. # para $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado com dengue sem estímulo com IFN- γ . A viabilidade das células infectadas não foi estatisticamente diferente ($P > 0,05$) em relação aos grupos que receberam apenas meio ou IFN- γ .

A ausência da expressão da enzima iNOS durante a infecção acarretaria em maior susceptibilidade à infecção?

5.9 Animais que não expressam a enzima iNOS tiveram taxa de mortalidade elevada após infecção com o vírus da dengue.

A maior susceptibilidade de animais $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ à infecção pelo vírus da dengue parece estar associada a menor capacidade destes animais em produzir NO. Desta forma, para averiguar qual o papel da enzima produtora do radical em questão, durante a infecção pelo vírus da dengue, animais geneticamente deficientes na produção da iNOS ($\text{iNOS}^{-/-}$), bem como seus controles selvagens (WT) foram infectados com 10PFU ou 1PFU do vírus e monitorados quanto à taxa de sobrevivência. Ao passo que 100% dos animais WT infectados com 1PFU estavam vivos após 14 dias da infecção, apenas 12,5% dos animais $\text{iNOS}^{-/-}$ resistiram à infecção (Figura 13). Da mesma forma, 100% dos animais $\text{iNOS}^{-/-}$ infectados com 10PFU do vírus sucumbiram até 10º dia de infecção, sendo que 90% dos animais WT sobreviveram por mais de 14 dias (Figura 13). É notável, no entanto, que os animais $\text{iNOS}^{-/-}$ resistem a um período de infecção ligeiramente maior que os animais $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ (Comparar Figura 6 e Figura 13), sugerindo que a produção de NO via iNOS não é o único mecanismo de combate à infecção ausente nos animais deficientes em $\text{IFN-}\gamma$.

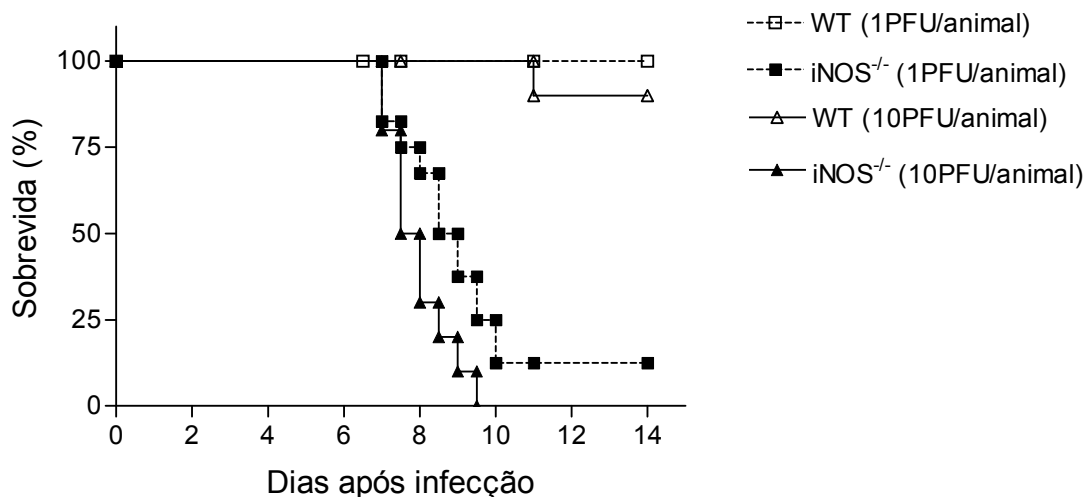


Figura 13: Letalidade induzida pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens. Camundongos selvagens (WT) ou deficientes na expressão de iNOS (iNOS^{-/-}) foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 1 ou 10PFU/100 μ L de PBS. Os grupos continham um número de 7-8 animais. A sobrevivência dos animais iNOS^{-/-} infectados com os inóculos de 1 e 10PFU foi estatisticamente diferente ($P < 0,05$) em relação aos grupos de animais WT infectados com 1 e 10PFU, respectivamente.

5.10 As alterações hematológicas desencadeadas pela infecção pelo vírus da dengue foram acentuadas em animais deficientes na expressão de iNOS.

As características hematológicas foram alteradas nos animais iNOS^{-/-} após infecção com o vírus da dengue. Reproduzindo os dados anteriores, os animais WT apresentaram plaquetopenia já no terceiro dia, sendo que esta permaneceu aumentada nos 5º e 7º dias de infecção. Da mesma forma como os animais IFN- γ ^{-/-}, animais iNOS^{-/-} apresentaram números de plaquetas circulantes ainda menores que os encontrados em animais WT. No entanto, este fenômeno foi manifestado apenas no sétimo dia de infecção. A plaquetopenia observada nos animais iNOS^{-/-} se manteve em níveis

comparados com os dos animais WT nos 3º e 5º dia de infecção (Figura 14A). Da mesma forma, animais WT apresentaram hemoconcentração no sétimo dia de infecção pelo vírus da dengue. Na ausência da expressão de iNOS, essa hemoconcentração foi ainda mais acentuada (Figura 14B).

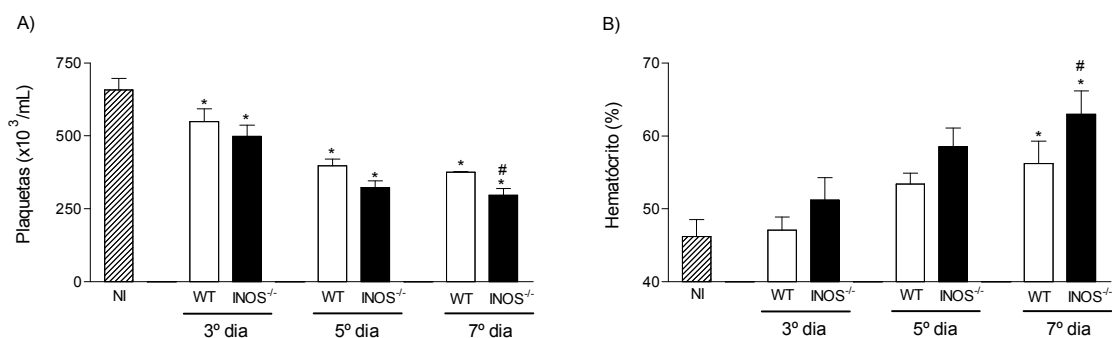


Figura 14: Alterações hematológicas induzidas pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens. Camundongos selvagens (WT) ou deficientes na expressão de iNOS (iNOS^{-/-}) foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 10PFU/100µL de PBS. Os grupos continham um número de 4-5 animais. As plaquetas (A) foram quantificadas em amostra de sangue heparinizado pelo método de impedância eletrônica. O hematócrito (B) foi obtido pela relação percentual entre a porção celular e a amostra total de sangue coletada em um tubo capilar após centrifugação. Os resultados foram expressos em número de plaquetas por mL de sangue ou em porcentagem e são média ± EPM de 4-5 animais por grupo. * para P < 0,05 quando comparado com animais não infectados (NI); # para P < 0,05 quando comparados com animais do selvagens.

5.11 Animais deficientes na expressão de iNOS apresentaram níveis elevados de TNF-α e IL-6.

Para finalizar a caracterização do curso da infecção em animais iNOS^{-/-}, o próximo passo foi averiguar se havia alteração nos níveis de citocinas pró-inflamatórias nestes animais. Desta forma, os níveis de TNF-α e IL-6 foram medidos no decorrer da

infecção de animais $iNOS^{-/-}$ e comparados àqueles de animais WT controles. Conforme descrito anteriormente, no 3º ou 5º dia após infecção, não houve liberação detectável da concentração sérica de TNF- α em animais WT porém houve um aumento significativo dessa citocina no 7º dia (Figura 15A) sendo que em animais $iNOS^{-/-}$ houve um aumento da concentração de TNF- α já no 5º dia com aumento ainda maior no 7º dia (Figura 15A). No fígado, houve aumento da concentração de TNF- α apenas no 5º dia após infecção nos animais WT, enquanto nos animais $iNOS^{-/-}$ esse aumento se manteve até o 7º dia de infecção. Já no baço, houve um aumento tempo-dependente da concentração de TNF- α tanto em animais WT como em animais $iNOS^{-/-}$, sendo que no 7º dia os animais $iNOS^{-/-}$ apresentaram uma concentração significativamente maior que os WT infectados. De maneira similar ao que ocorre com a concentração de TNF- α , apenas após 7 dias de infecção, animais WT apresentaram um aumento significativo na liberação de IL-6 no soro, sendo que esse aumento é ainda maior em animais $iNOS^{-/-}$ (Figura 15D). Em animais WT, a produção de IL-6 no fígado apresentou pico no 5º dia pós infecção, já nos animais $iNOS^{-/-}$ houve aumento da produção dessa citocina em todos os tempos avaliados. No baço, por sua vez tanto em animais WT quanto em animais $iNOS^{-/-}$ houve um aumento da produção de IL-6 no 5º e 7º dia após infecção, sendo que no 7º dia os animais $iNOS^{-/-}$ apresentaram aumento significativo quando comparados a animais WT.

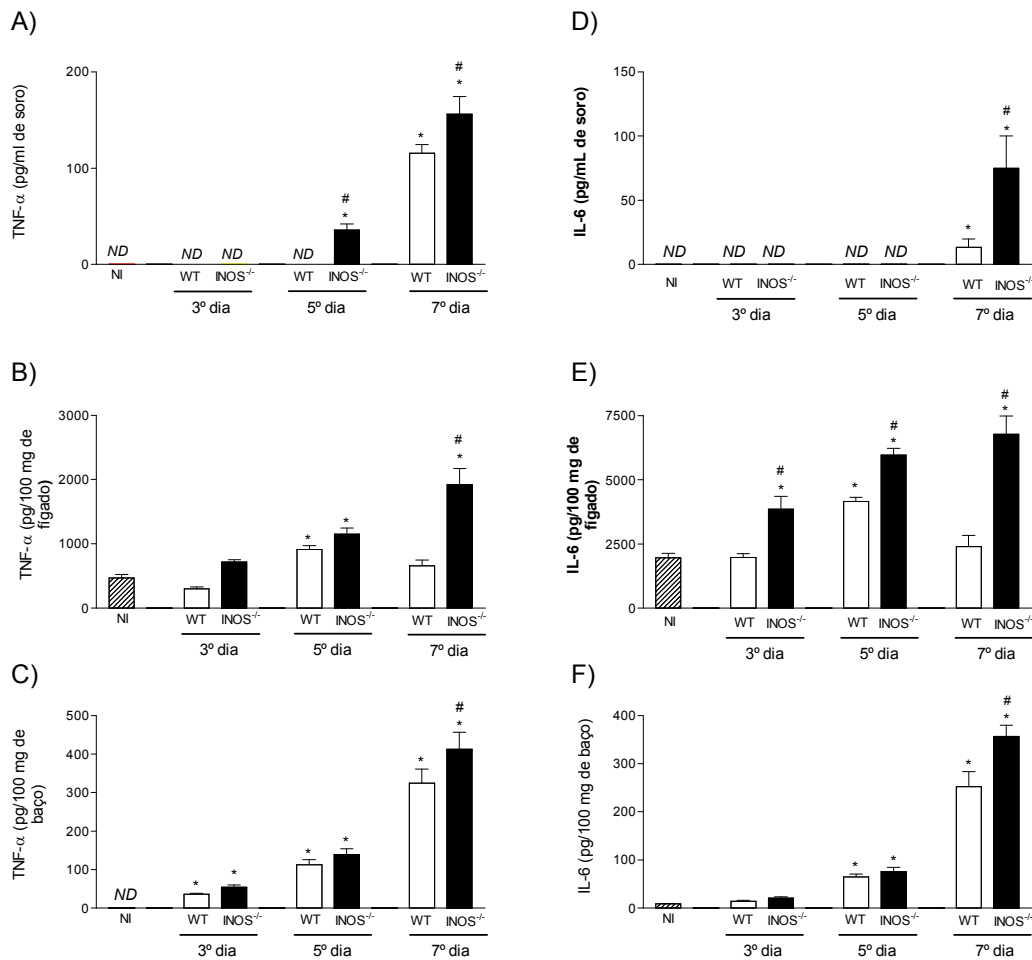


Figura 15: Produção das citocinas TNF- α e IL-6 desencadeada pela infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens. TNF- α e IL-6 foram medidas por ELISA específico no soro (A), fígado (B) e baço (C) dos animais. Camundongos selvagens (WT) ou deficientes na expressão de iNOS (INOS^{-/-}) foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 10PFU/100 μ L de PBS, anestesiados e sacrificados para coleta dos tecidos citados no tempo indicado. Resultados são apresentados como pg de TNF- α ou IL-6 por 100 mg de tecido ou pg de TNF- α ou IL-6 por mL de soro e são média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. ND para concentrações não detectáveis da citocina; * para P < 0,05 quando comparado com animais não infectados (NI); # para P < 0,05 quando comparados com animais selvagens.

5.12 A susceptibilidade aumentada de animais $iNOS^{-/-}$ não está associada a prejuízo na produção de $IFN-\gamma$.

Os resultados anteriores demonstram que animais $iNOS^{-/-}$ apresentam uma infecção de caráter mais grave, associada com as mesmas manifestações encontradas nos animais $IFN-\gamma^{-/-}$, a saber alterações hematológicas acentuadas, produção sistêmica exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e maior taxa de letalidade. É interessante ressaltar que todas as alterações encontradas nos animais $iNOS^{-/-}$ se manifestaram sem que haja prejuízo da produção de $IFN-\gamma$ por parte destes animais. Como demonstrado na figura 16A-C, a produção da citocina por camundongos $iNOS^{-/-}$ após a infecção com o vírus da dengue foi semelhante à produção encontrada nos animais WT, como ilustrado para o fígado, baço e soro. Desta forma, a maior susceptibilidade à infecção na ausência da $iNOS$ durante a infecção é independente da atividade do $IFN-\gamma$.

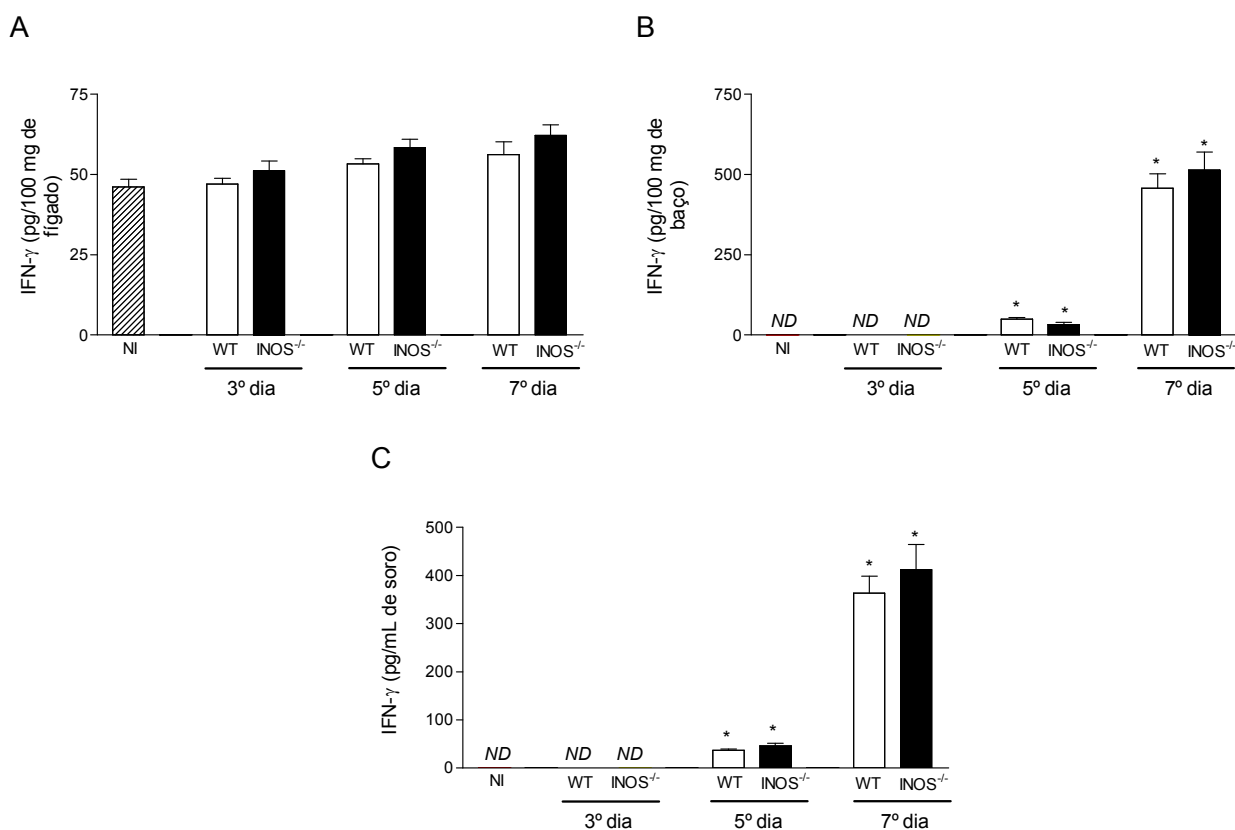


Figura 16: Produção da citocina IFN- γ com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens. IFN- γ foi mensurada por ELISA específico no fígado (A), baço (B) e soro (C) dos animais. Camundongos selvagens (WT) ou deficientes na expressão de iNOS (INOS^{-/-}) foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 10PFU/100 μ L de PBS, anestesiados e sacrificados para coleta dos tecidos citados no tempo indicado. Resultados são apresentados como pg de IFN- γ por 100 mg de tecido ou pg de IFN- γ por mL de soro e são média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. ND para concentrações não detectáveis da citocina; * para P < 0,05 quando comparado com animais não infectados (NI); # para P < 0,05 quando comparados com animais selvagens.

Qual o papel da enzima iNOS na resposta inflamatória característica da infecção pelo vírus da dengue?

5.13 Animais deficientes na expressão de iNOS apresentaram reduzido influxo de neutrófilos para o pulmão e menor produção de quimiocinas após infecção com o vírus da dengue.

Contrastando com os achados da infecção de animais $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$, o influxo de neutrófilos para o pulmão de animais $\text{iNOS}^{-/-}$ infectados com o vírus da dengue não esteve aumentado. O influxo de neutrófilos no pulmão de animais WT se manteve elevado durante toda a infecção. No entanto, animais $\text{iNOS}^{-/-}$ apresentaram uma redução do número destas células já no 5º dia de infecção, o que se manteve no 7º dia (Figura 17A). Esta redução no recrutamento neutrofilico se deu mesmo na presença de níveis elevados da quimiocina CXCL1. De fato, os níveis desta quimiocina de animais WT e $\text{iNOS}^{-/-}$ durante todo o curso da infecção foram semelhantes neste órgão (Figura 17B). Além disso, a alta produção de CXCL1 se manteve elevada também no fígado de animais $\text{iNOS}^{-/-}$. Mais uma vez, a produção desta quimiocina pelos animais $\text{iNOS}^{-/-}$ foi semelhante à de animais WT (Figura 17D). No entanto, a produção de CCL2, ainda que elevada em relação aos níveis basais, esteve reduzida no fígado de animais $\text{iNOS}^{-/-}$ quando comparadas com a dos animais WT (Figura 17C). Desta forma, a resposta inflamatória de animais deficientes na expressão de iNOS infectados com o vírus da dengue parece estar reduzida.

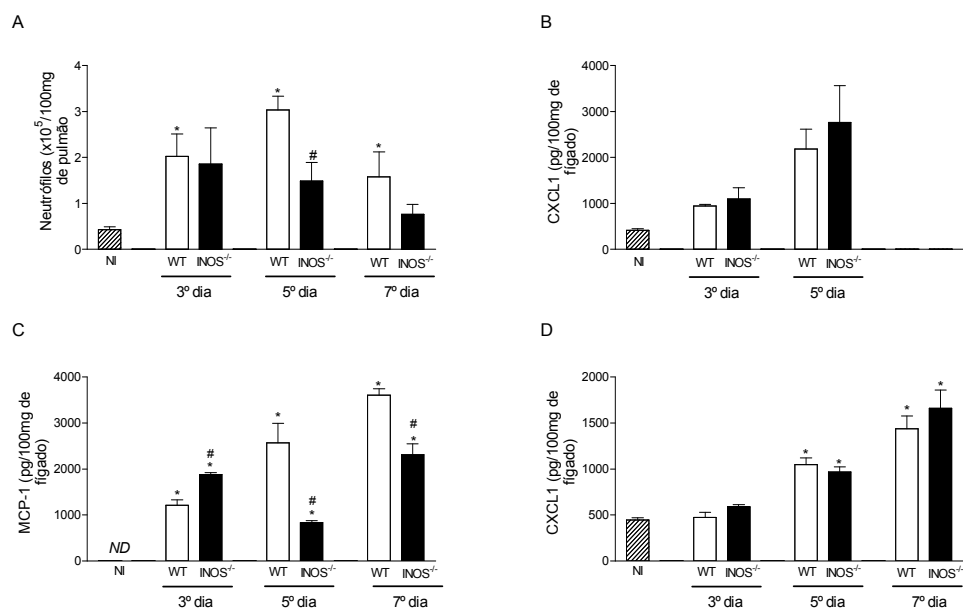


Figura 17: Influxo de neutrófilos e produção de quimiocinas no pulmão e fígado após infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS (iNOS^{-/-}) comparados com animais selvagens. A migração de neutrófilos (A) foi avaliada pela medida dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO). CXCL1 no pulmão (B) CCL2 no fígado (C) e CXCL1 no fígado (D) foram medidas por ELISAs específicos nos tecidos. Os animais foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de 10PFU/100µL de PBS, anestesiados e sacrificados para coleta dos tecidos citados no tempo indicado. Resultados são apresentados como número de neutrófilos por 100mg de tecido ou pg de CXCL1 ou CCL2 por 100 mg de pulmão ou fígado e são média ± EPM de 5-6 animais por grupo. * para P < 0,05 quando comparado com animais não infectados (NI). # para p < 0,05 quando comparado com animais WT infectados.

A enzima iNOS estaria envolvida no controle da replicação viral durante a infecção pelo vírus da dengue?

5.14 Animais deficientes na expressão de iNOS apresentaram carga viral elevada após infecção com o vírus da dengue.

Os resultados anteriores apontaram para uma maior susceptibilidade por parte dos animais iNOS^{-/-} frente à infecção com o vírus da dengue. Além disso, alguns

estudos têm demonstrado que o NO seria capaz de suprimir a replicação do sorotipo 2 do vírus da dengue (CHARNSILPA *et al.*, 2005; TAKHAMPUNYA *et al.*, 2006). Desta forma, buscamos averiguar se a maior susceptibilidade dos animais $iNOS^{-/-}$ à infecção estava associada a incapacidade de combate à replicação viral. De fato, a carga viral presente no baço destes animais após 5 dias de infecção esteve significativamente elevada em relação àquela presente no mesmo tecido de animais WT (Figura 18). Assim, pode-se concluir que há um prejuízo no combate à replicação viral na ausência da expressão de iNOS.

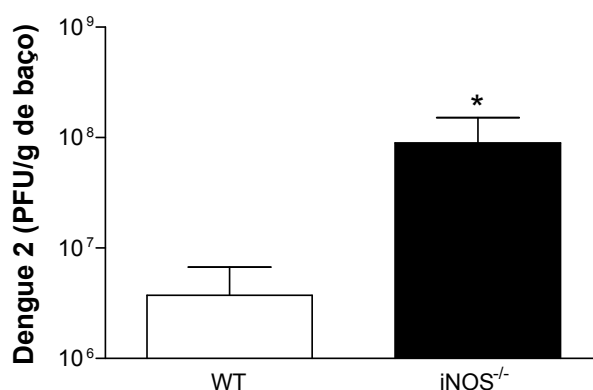


Figura 18: Quantificação de unidades formadoras de placas (PFU) após a infecção com o vírus Dengue-2 em camundongos deficientes na expressão de iNOS comparados com animais selvagens. A quantificação do título viral foi obtida por ensaio de titulação usando células permissivas à infecção pelo vírus da Dengue. Camundongos selvagens (WT) ou deficientes na expressão de iNOS ($iNOS^{-/-}$) foram infectados com o vírus Dengue-2 pela injeção i.p. de $10PFU/100\mu L$ de PBS, anestesiados e sacrificados para coleta do baço no quinto dia de infecção. Resultados são apresentados como PFU por mg de tecido e são média \pm EPM de 5-6 animais por grupo. * para $P < 0,05$ quando comparado com animais selvagens.

6. DISCUSSÃO

A resposta imunológica é um evento complexo. Múltiplos sistemas como a imunidade inata e adquirida, a hipersensibilidade imediata e a tardia além do sistema do complemento, se interagem e sofrem modulação de outros sistemas como as cascatas de coagulação e fibrinólise e o sistema nervoso autônomo (TRACEY, 2007). Os componentes envolvidos na resposta imunológica, por sua vez, também estão organizados de maneira complexa (PETRANYI, 2002) exibindo um gama variável de respostas frente a uma multiplicidade de situações. Isto se estende para a resposta imune a agentes infecciosos. De fato, as defesas antimicrobianas do hospedeiro são numerosas e variadas, envolvendo mecanismos humorais e celulares, sejam eles inatos ou adaptativos (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Entretanto, ainda que necessária para a sobrevivência do organismo, a imunidade tem potencial de causar lesão ao hospedeiro. Isto é evidente em muitas infecções, em que a lesão tecidual e a doença podem ser causadas pela resposta do hospedeiro ao microrganismo e aos seus produtos (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Desta forma, o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos numa doença infecciosa, sejam eles causadores de lesão tecidual ou não, se demonstra importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e/ ou vacinais.

No que tange à infecção pelo vírus da dengue, o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resposta do hospedeiro ainda se mostram bastante incipientes (ROTHMAN, 2003). De fato, o principal mecanismo que leva à manifestação da forma hemorrágica da infecção se mostra obscuro, o que resulta na ineficácia das medidas preventivas e terapêuticas contra a doença. Este cenário se torna preocupante, dado o alto número de infecções registrado nos últimos anos. Na América Latina, Caribe e Ásia, a infecção tem recebido grande atenção por parte das autoridades de saúde pública e nos últimos vinte anos, o número de casos cresceu vertiginosamente, acompanhando a disseminação dos diferentes sorotipos virais (RIGAU-PÉREZ, 2006).

Deste modo, o estudo dos mecanismos de resposta do hospedeiro durante a infecção se mostra bastante pertinente. De maneira mais específica, a patogênese da infecção pelo dengue parece estar intimamente associada à resposta imune do hospedeiro. A manifestação da FHD tem sido atribuída a fatores tais como a presença de anticorpos de reatividade cruzada, ativação indesejada de células B e T, e efeitos pró-inflamatórios de citocinas (CLYDE *et al.*, 2006). Assim, um melhor conhecimento dos eventos imunológicos pode fornecer informações importantes sobre a patogênese da doença.

Na miríade de moléculas e mecanismos envolvidos na resposta do hospedeiro a agentes infecciosos, o IFN- γ merece destaque. Em 1983, Nathan e colaboradores demonstraram que a citocina em questão era responsável pela explosão respiratória e eliminação de parasitas por parte de macrófagos humanos. Desde então, o controle de diversas atividades imunorreguladoras de importante participação na resposta a infecções tem sido atribuído ao IFN- γ (revisto por BOEHM *et al.*, 1997 e SCHRODER *et al.*, 2004). Além disso, diversas atividades anti-virais têm sido atribuídas à citocina. Estes dados, por si só, suportam o estudo do envolvimento dessa citocina na patogênese da infecção pelo vírus da dengue. De fato, a participação da citocina na resposta à infecção é evidente. Níveis elevados de IFN- γ são encontrados em pacientes com FD ou FHD (KURANE *et al.*, 1993; NGUYEN *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005, 2006b; CHAKRAVARTI *et al.*, 2006). E, de maneira interessante, proteínas virais, entre elas a proteína NS4B, são capazes de inibir a resposta celular induzida pelo tratamento com IFN- γ , permitindo uma replicação viral contínua e disseminação do vírus (MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2003). Essas evidências sugerem que a citocina em questão desempenha um importante papel na resposta do hospedeiro ao vírus.

A correlação dos elevados níveis de IFN- γ com a sobrevivência de pacientes com FHD (CLYDE *et al.*, 2006) e a extrema susceptibilidade de camundongos

deficientes em IFN- γ (deficiência conjunta de IFN- γ e IFNs do tipo 1) (SHRESTA *et al.*, 2004, 2005, 2006) suportam a idéia de que a citocina tem papel crítico no controle da infecção pelo dengue. Nossos dados corroboram esta hipótese. Camundongos selvagens infectados com o vírus adaptado ao hospedeiro murino apresentam níveis elevados da citocina no tecido hepático, já no terceiro dia de infecção. Além disso, há produção sistêmica do IFN- γ a partir do quinto dia de infecção e esta se mantém aumentada até o sétimo dia. Essa elevada produção foi correlacionada com elevada taxa de sobrevivência nos animais selvagens infectados. Paralelamente, animais IFN- $\gamma^{-/-}$ se mostraram muito mais susceptíveis à infecção com o vírus adaptado, com altos níveis de letalidade, mesmo após poucos dias de infecção. Da mesma forma, as manifestações clínicas características da infecção foram agravadas em animais IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados. Tanto a contagem de plaquetas quanto o índice de hematócrito estavam significativamente aumentados nesses animais em relação aos animais WT infectados.

Esta manifestação mais grave da infecção por parte dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ foi caracterizada também por elevados níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α , tanto teciduais quanto sistêmicos, em relação àqueles de animais selvagens. O TNF- α é um importante regulador da imunidade inata e da inflamação aguda (ABBAS & LICHTMAN, 2005). No entanto, em níveis elevados, a citocina é uma importante causa de complicações sistêmicas, entre elas o choque (CHATURVEDI, 2006). A produção elevada de TNF- α após a infecção com o vírus da dengue foi inicialmente demonstrada por Vitarana *et al* (1991) e, desde então, diversos trabalhos tem demonstrado o aumento dos níveis desta citocina após a infecção pelo vírus da dengue. De fato, o TNF- α está entre as primeiras citocinas a aparecer tanto em pacientes quanto em cultura de leucócitos periféricos humanos infectados com dengue (CHATURVEDI *et al.*, 1999, 2000, 2004). Além disso, os níveis desta citocina estão particularmente elevados em

pacientes com FHD (HOBER *et al.*, 1993; PINTO *et al.*, 1999; CARDIER *et al.*, 2005; CHAKRAVARTI & KUMARIA, 2006).

Acredita-se que a liberação sistêmica do TNF- α é um dos causadores do aumento da permeabilidade vascular nesses pacientes (CLYDE *et al.*, 2006). Isso pode ser explicado pelos seus efeitos pró-inflamatórios em células endoteliais, uma vez que o TNF- α é capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão nestas células, contribuindo para o recrutamento celular (MUKHOPADYAY *et al.*, 2006). Além disso, a citocina estimula a liberação de produtos do ácido araquidônico, como as prostaciclina, que provocam vasodilatação (potencialmente importante no aumento de permeabilidade vascular) (AGGARWAL, 2003). A participação do TNF- α na patogênese da infecção pelo dengue tem sido corroborada também por modelos animais, onde são detectados níveis elevados da citocina após a infecção e o tratamento com anticorpos anti-TNF resulta em manifestações mais brandas da doença e letalidade reduzida (ATRASHEUSKAYA *et al.*, 2003; SHRESTA *et al.*, 2006). Assim, a produção de TNF- α parece estar diretamente correlacionada a ocorrência da forma grave da doença e, portanto, os altos níveis desta citocina nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ podem justificar a maior susceptibilidade à infecção. Além disso, o aumento da produção sérica de TNF- α pode, em parte, ser responsável pelo aumento da letalidade em animais IFN- $\gamma^{-/-}$.

Além do TNF- α , a produção de IL-6 sérica estava aumentada nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados com o vírus da dengue em relação aos animais WT infectados. A produção elevada desta citocina também tem sido relatada em pacientes e correlacionada com a manifestação da FHD (CHATURVEDI *et al.*, 2000). Por fim, proteínas NS1 são capazes de estimular a produção de IL-6 por DCs (CHUA *et al.*, 2005). A IL-6 é também uma citocina pró-inflamatória, com diversas atividades

imunomodulatórias e hematopoiéticas, além de estar envolvida na indução de febre e na produção aumentada de proteínas da fase aguda pelo fígado (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Embora os mecanismos não sejam bem descritos, supõe-se que esta citocina tenha papel importante na produção local ou sistêmica de anticorpos com reatividade cruzada com plaquetas e células endoteliais, o que levaria ao aumento da permeabilidade vascular e hemorragia (RACHMAN & RINALDI, 2006). Assim, a produção elevada de IL-6 por parte dos animais deficientes na expressão de IFN- γ após a infecção com o vírus da dengue pode resultar numa manifestação mais grave da doença. Entretanto, nos demais órgãos avaliados a produção de IL-6 está diminuída quando comparada a animais WT. Apesar de aparentemente controverso, esse resultado pode refletir, em parte, o prejuízo do hospedeiro em lidar com a infecção.

O desenvolvimento de uma patologia agravada durante a infecção de animais IFN- γ ^{-/-} parece estar associada à inabilidade do hospedeiro em controlar a replicação viral. Como descrito anteriormente, essa hipótese tem sido suportada por achados de outros grupos (CLYDE *et al.*, 2006). De fato, animais IFN- γ ^{-/-} apresentam títulos virais no baço, após 5 dias de infecção, significativamente elevados quando comparados com os animais selvagens. Isto sugere que houve disseminação viral pelo organismo. Dada a capacidade do vírus em promover a ativação leucocitária e endotelial e a indução da secreção de TNF- α por estas células, parece pertinente atribuir os níveis elevados dessa citocina à reduzida capacidade do hospedeiro de combater a replicação viral, na ausência do IFN- γ . Assim, a manifestação de um fenótipo mais grave da infecção por parte dos animais IFN- γ ^{-/-} parece envolver prejuízo no combate ao vírus e conseqüente ativação sistêmica de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular, plaquetopenia e morte

De fato, o IFN- γ tem papel fundamental no orquestramento de respostas celulares a agentes infecciosos em geral. Um dos mecanismos desencadeado pela ação da citocina está a coordenação do tráfico de leucócitos para sítios inflamatórios através do estímulo da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas (SCHRODER *et al.*, 2004). Dentre as quimiocinas cuja produção é regulada por IFN- γ está a quimiocina CCL-2 (ROLLERS *et al.*, 1990; GIL *et al.*, 2001). Nossos resultados demonstram que animais IFN- $\gamma^{-/-}$ apresentaram níveis hepáticos reduzidos dessa quimiocina após infecção com o vírus da dengue. A CCL2 está envolvida no recrutamento de monócitos, linfócitos e células *natural killers* para sítios de inflamação, seja de origem infecciosa ou não (CHARO *et al.*, 2006). Além disso, estudos demonstram que perda da função desta quimiocina está associada a prejuízo em combate à infecção de diversas origens (LEONARD & YOSHIMURA, 1990). Além disso, os níveis de outra quimiocina, a CXCL1, estavam reduzidos no mesmo órgão destes animais. A CXCL1 tem atividade quimiotática para neutrófilos bem caracterizada (CHARO *et al.*, 2006). Embora não tão óbvia, a indução dessa quimiocina pelo IFN- γ parece ocorrer em resposta à infecção e é necessária para o controle ideal do crescimento microbiano (FENG *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2007). Os níveis teciduais reduzidos destas quimiocinas sugerem um prejuízo da resposta inflamatória frente à infecção nos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$. Isso poderia, em parte, levar a um controle incipiente da replicação viral e conseqüente agravamento da doença. Deste modo, a inabilidade em combater a replicação do vírus da dengue por parte dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ parece estar associada à incapacidade de indução de uma resposta inflamatória desejável.

No entanto, níveis elevados das duas quimiocinas em questão têm sido correlacionados à manifestação da forma hemorrágica da infecção pelo dengue. De fato, a expressão de CCL2 em pacientes com FHD foi relatada por Lee e colaboradores

(2006). Além disso, CCL2 estaria envolvida na ruptura das junções de células endoteliais vasculares humanas e no conseqüente aumento da permeabilidade vascular desencadeada pelo vírus da dengue (LEE *et al.*, 2006). Paralelamente, os níveis de mRNA para a quimiocina IL-8, homóloga humana da CXCL-1 murina, estão elevados em indivíduos que desenvolveram FHD (RAGHUPATHY *et al.*, 1998). A infecção de células endoteliais com o vírus da dengue é capaz de induzir a liberação de IL-8, que levaria a rearranjos no citoesqueleto e aumento na permeabilidade vascular (TALAVERA *et al.*, 2004). Portanto, níveis sistêmicos elevados destas quimiocinas estariam associados à ativação endotelial e aumento da permeabilidade vascular, resultando em um fenótipo mais grave durante o desenrolar da infecção.

A liberação no pulmão de altos níveis de CXCL1 está associada à efusão pleural, provavelmente devido ao recrutamento maciço de neutrófilos, os quais provocam lesões estruturais importantes (MALLICK *et al.*, 2004). Acredita-se que essas alterações ocorrem, principalmente, devido à estrutura do tecido pulmonar. Esse órgão possui capilares sanguíneos com o lúmen extremamente estreito, o que facilita a diapedese de neutrófilos para o tecido, com menor participação de moléculas de adesão em relação a outros órgãos (BURNS *et al.*, 2003). Assim, com aumento do número de mediadores inflamatórios na circulação e, como conseqüência, um maior infiltrado celular, há um comprometimento da estrutura dos vasos pulmonares. Nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados, uma maciça produção de CXCL1, no pulmão, foi observada. Esta produção elevada da quimiocina foi acompanhada de um intenso influxo de neutrófilos no tecido destes animais. Parece razoável atribuir esse aumento no influxo pulmonar de neutrófilos dos animais IFN- $\gamma^{-/-}$ aos fenômenos descritos anteriormente. De fato, os níveis sistêmicos de mediadores inflamatórios (TNF- α e IL-6 – Figura 8) estão elevados nesses animais. A lesão pulmonar desencadeada por estes acontecimentos pode ser mais um dos

mecanismos que contribuíram para a maior gravidade da infecção nos camundongos IFN- γ ^{-/-}.

Outras quimiocinas, além das citadas anteriormente, parecem estar envolvida na resposta do hospedeiro à infecção pelo dengue. Entre elas, destaca-se a quimiocina CXCL10. Estudos em modelos animais demonstraram que a produção desta está elevada em camundongos selvagens após a infecção pelo vírus da dengue (CHEN *et al.*, 2006a). Além disso, este estudo demonstrou que a quimiocina em questão é capaz de competir com o vírus pela ligação ao sulfato de heparana na superfície celular, levando a redução da replicação viral. Por fim camundongos deficientes na expressão de CXCL10 e do receptor que medeia suas ações, CXCR3, apresentam susceptibilidade aumentada à infecção (HSIEH *et al.*, 2006). A indução desta quimiocina pelo IFN- γ é bem demonstrada (TAUB *et al.*, 1993; GIL *et al.*, 2001) e o bloqueio da ação desta quimiocina está associada à redução recrutamento de linfócitos T CD8 e células NK durante a infecção pelo vírus da dengue (CHEN *et al.*, 2006a; HSIEH *et al.*, 2006). No entanto, a produção desta quimiocina após a infecção pelo vírus da dengue não foi examinada neste trabalho. Assim, a caracterização do papel dessas quimiocinas e das demais aqui estudadas na infecção pelo vírus da dengue merece maior investigação.

A fonte principal do IFN- γ na infecção pelo vírus da dengue também necessita de investigação. A produção da citocina já nos primeiros dias de infecção (Figura 6) e a letalidade bastante adiantada dos animais IFN- γ ^{-/-} (Figura 7) suportam a idéia de que a produção se dá durante os eventos iniciais da infecção e envolve a mobilização de células da imunidade inata. Assim, células NK parecem ser o candidato principal da fonte do IFN- γ no modelo de infecção em questão. De fato, outros estudos sugerem isto. Azeredo *et al* (2006) demonstraram que aumentos percentuais no número de células NK e de células NK ativadas estão associados a manifestações mais brandas de FD. O

oposto também foi demonstrado, ou seja, números reduzidos de células NK e células NK ativada correlacionaram com infecções mais graves. Estudos anteriores em pacientes tailandeses demonstraram que havia redução do número de células NK em pacientes com FHD em comparação com pacientes com FD (GREEN *et al.*, 1999). Por fim, estudos animais demonstram uma ativação inicial de células NK após a infecção como vírus da dengue (SHRESTA *et al.*, 2004). Se este padrão ocorre no modelo em questão, no entanto, se mantém obscuro. Além disso, a participação de células NKT, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ na produção de IFN- γ durante a infecção não pode ser descartada.

Os fagócitos ativados por IFN- γ podem desempenhar um papel importante na eliminação viral, parcialmente via a produção de NO (MACMICKING *et al.*, 1997). Estudos recentes demonstram que o radical tem atividade inibitória sobre a replicação do sorotipo 2 do vírus (CHARNSILPA *et al.*, 2005; TAKHAMPUNYA *et al.*, 2006). Além disso, a expressão da enzima iNOS por monócitos de sangue periféricos de pacientes com FD precede a eliminação do vírus e controle da infecção (NEVES-SOUZA *et al.*, 2005). Assim, parece pertinente atribuir parte do prejuízo na capacidade virustática dos animais IFN- γ ^{-/-} à reduzida produção de NO. Corroborando esta hipótese, a capacidade de DCs de manter a produção de Óxido nítrico após a infecção *in vitro* com o vírus da dengue também demonstrou ser dependente da presença de IFN- γ . Após 48 e 72 horas de infecção, apenas células primadas com a citocina mantêm a produção do gás em níveis significativos. Desta forma, o IFN- γ parece ser essencial para a ativação da via microbicida mediada pela enzima iNOS e pelo óxido nítrico após a infecção com o vírus da dengue. Entretanto, em macrófagos infectados com dengue *in vitro*, o estímulo com o vírus sozinho ou o vírus na presença de IFN- γ não foi capaz de induzir a produção de NO. De forma similar, não foi encontrado NO detectável pelo

método de Griess no plasma de animais WT ou IFN- $\gamma^{-/-}$ infectados com o vírus da Dengue.

Sendo que a principal fonte de NO em processos inflamatórios é a isoforma induzida de NO (iNOS), nós avaliamos a expressão dessa enzima após infecção pelo vírus da dengue. Entretanto, nossos resultados preliminares não demonstraram o aumento da expressão dessa enzima no baço de animais infectados e experimentos mais conclusivos, incluindo a avaliação em outros tecidos, estão em andamento. A infecção de animais iNOS $^{-/-}$, no entanto, dá suporte à hipótese do importante papel desempenhado pela enzima e pelo óxido nítrico durante a infecção pelo vírus da dengue. De maneira mais específica, nossos resultados permitem atribuir à iNOS e ao NO um importante papel de controle da replicação viral durante a infecção pelo vírus da dengue. Animais iNOS $^{-/-}$ apresentaram elevação do título viral no baço após o quinto dia de infecção (Figura 19). De maneira interessante, a elevação na replicação nestes animais foi semelhante à encontrada nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$. Além disso, o curso da infecção nestes animais apresentou alterações semelhantes às observadas nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$. De fato, os animais iNOS $^{-/-}$ apresentaram elevadas taxas de letalidade após a infecção com o vírus da dengue. A redução nos níveis de plaquetas e o aumento do índice de hematócrito também se mostraram acentuados nestes animais. Por fim, houve uma produção exacerbada, tanto tecidual quanto sistêmica, das citocinas TNF- α e IL-6 nos animais iNOS $^{-/-}$ infectados. Isto nos permite sugerir que a manifestação agravada da infecção, tanto nos animais iNOS $^{-/-}$ quanto nos animais IFN- $\gamma^{-/-}$, seria advinda do controle inadequado da replicação do vírus da dengue no organismo. A disseminação viral levaria, então, à lesão endotelial e aos sintomas característicos da doença. Esta hipótese parece plausível, mas para que se chegue a essa conclusão, novas investigações são necessárias.

Interessantemente, a letalidade nos animais $iNOS^{-/-}$ foi sutilmente atrasada em relação aos animais $IFN-\gamma^{-/-}$. As alterações hematológicas características da infecção também se mostraram agravadas nos camundongos $iNOS^{-/-}$ em relação aos animais selvagens, porém não tão acentuadas quanto nos animais $IFN-\gamma^{-/-}$. Este padrão sugere que a redução na produção de NO não é unicamente responsável pela extrema susceptibilidade dos animais $IFN-\gamma^{-/-}$. Desta forma, os altos níveis teciduais e sistêmicos de $IFN-\gamma$ encontrados nos animais $iNOS^{-/-}$ justificaria a diferença de susceptibilidade entre os dois animais após a infecção pelo dengue. A presença desta citocina nos camundongos deficientes em $iNOS$ levaria a ativação de outros mecanismos de controle da infecção, especialmente nos estágios iniciais da infecção. No entanto, estes não seriam suficientes para suprir o papel desempenhado pelo NO no controle da replicação viral em tempos mais avançados da infecção. Haveria então, aumento dos títulos virais nos tecidos do hospedeiro e conseqüente agravamento da doença.

Quais seriam, portanto, estes mecanismos complementares atuantes na presença do $IFN-\gamma$, mesmo na ausência do NO proveniente de $iNOS$? A resposta inflamatória parece estar comprometida também nesses animais, dado o reduzido influxo de neutrófilos para o pulmão e as quantidades reduzidas da quimiocina CCL2 no fígado, de modo que este não seria o mecanismo compensador desencadeado pelo $IFN-\gamma$. A ativação das células da imunidade inata envolvidas na resposta ao vírus representa um mecanismo candidato potencial. Macrófagos e DCs, alvos principais da infecção pelo vírus, são células importantes na transição entre imunidade inata e adaptativa (ABBAS & LICHTMAN, 2005; CLYDE *et al.*, 2006). Nossos resultados demonstram que a ausência de $IFN-\gamma$, além do prejuízo na produção de NO, acarreta em produção reduzida de $TNF-\alpha$, um importante marcador de ativação de fagócitos (dados não mostrados) por parte de DCs infectadas com o vírus da dengue. Da mesma forma, a produção de $TNF-$

α por parte de macrófagos peritoneais frente à infecção *in vitro* pelo vírus da Dengue também é dependente do estímulo com IFN- γ (dados não mostrados). Assim, essa citocina parece ser imprescindível para uma resposta adequada ao vírus por parte de macrófagos e DCs. Além disso, os efeitos estimulatórios desencadeados pelo IFN- γ sobre essas duas populações celulares durante a resposta a infecções é bem descrito (SCHRODER *et al.*, 2004). Deste modo, podemos sugerir que o desencadeamento de uma resposta inata à infecção está prejudicado na ausência de IFN- γ . Sabendo-se que a produção de IFN- γ não está alterada nos animais iNOS^{-/-} infectados com o vírus da dengue, parece pertinente sugerir que, pelo menos, parte destes mecanismos estão atuantes durante o curso da infecção. Desta forma, a ativação de mecanismos inatos de defesa à infecção não estaria tão prejudicada e o combate à infecção se daria de maneira ligeiramente acentuada. Isso poderia justificar o atraso no agravamento da doença observados nos animais iNOS^{-/-}. No entanto, a melhor caracterização dessa hipótese se faz necessária.

Em resumo, o conjunto de dados apresentados aqui sugere que a citocina IFN- γ desempenha papel fundamental na proteção do hospedeiro frente a uma infecção primária com o vírus da dengue. Na ausência do IFN- γ , há marcante incapacidade de controle da replicação viral, levando a uma manifestação mais grave da infecção. Dentre os mecanismos de resposta à infecção desencadeados pelo IFN- γ podemos inferir que está a transcrição aumentada da enzima iNOS e conseqüente aumento na liberação da espécie microbicida NO. A produção do óxido nítrico no combate à infecção se mostrou de extrema importância, visto que animais deficientes na enzima iNOS também apresentam manifestação mais grave da doença. Podemos, ainda, inferir que a produção reduzida destas últimas moléculas também acarreta em maior susceptibilidade à infecção pelo vírus da dengue.

Assim, a produção de óxido nítrico induzida pelo IFN- γ é uma via importante na resposta à infecção pelo vírus da dengue. Estratégias que elevem a produção destas moléculas podem resultar em benefícios no controle da infecção primária pelo vírus da dengue.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 2005. 5ª Edição. Editora Elsevier.

Adler EM. Viruses – Focus issue: Virus-Miniature Machiavellis of the signaling world? *Sci. STKE*. 2006; **eg7**.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:745-756.

Akarid K, Sinet M, Desforges B, Gougerot-Pocidallo MA. Inhibitory effect of nitric oxide on the replication of a murine retrovirus in vitro and in vivo. *J.Virol.* 1995; **69**:7001-7005.

Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 2003; **35**:33-42.

Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J.Immunol.* 1998; **161**:6338-6346.

Azeredo EL, Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin.Exp.Immunol.* 2006; **143**:345-356.

Bach EA, Tanner JW, Marsters S *et al.* Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells. *Mol.Cell Biol.* 1996; **16**:3214-3221.

Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, Stuehr DJ. Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J.Biol.Chem.* 1993; **268**:21120-21129.

Balmaseda A, Hammond SN, Perez L *et al.* Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2006; **74**:449-456.

Beretta, L., Gabbay, M., Berger, R., Hanash, S. M., Sonenberg, N. Expression of the protein kinase PKR is modulated by IRF-1 and is reduced in 5q- associated leukemias. *Oncogene* 1996; **12**, 1593–1596.

Bethell DB, Flobbe K *et al.* Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 1998; **177**:778-782

Bi Z, Reiss CS. Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by nitric oxide. *J.Virol.* 1995; **69**:2208-2213.

Bluysen, AR, Durbin, JE, Levy, DE. ISGF3 gamma p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; **7**: 11-17.

Bokisch VA, Top FH, Jr., Russell PK, Dixon FJ, Muller-Eberhard HJ. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. *N.Engl.J.Med.* 1973; **289**:996-1000.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 1997; **15**:749-795.

Briscoe J, Guschin D, Rogers NC *et al.* JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 1996; **351**:167-171.

Buchmeier, N. A., Schreiber, R. D. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; **82**, 7404–7408.

Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1988; **38**:172-180.

Burns JP. Septic shock in the pediatric patient: Pathogenesis and novel treatments. *Pediatr. Emerg. Care* 2003; **19**:112-115.

Cardier JE, Marino E, Romano E *et al.* Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine* 2005; **30**:359-365.

Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J. Med. Res.* 2006; **123**:25-30.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 1990; **44**:649-688.

Charnsilpa W, Takhampunya R, Endy TP, Mammen MP, Jr., Libraty DH, Ubol S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. *J. Med. Virol.* 2005; **77**:89-95.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 2006; **354**:610-621.

Chaturvedi UC, Elbishbishi EA *et al.*. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol.* 1999; **59**:335-40.

Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; **28**: 183-8.

Chaturvedi UC. Tumour necrosis factor & dengue. *Indian. J. Med. Res.* 2006; **123**:11-14.

Chen Y, Maguire T, Hileman RE *et al.* Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* 1997; **3**:866-871.

Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J.Virol.* 1999; **73**:2650-2657.

Chen RF, Liu JW, Yeh WT *et al.* Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 2005; **44**:43-50.

Chen JP, Lu HL, Lai SL *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.* 2006a; **177** :3185-3192.

Chen LC, Lei HY, Liu CC *et al.* Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2006b; **74**:142-147.

Chesler DA & Reiss SS. The role of IFN- γ in immune response to viral infections of the central nervous system. *Cyt. Growth Factors Rev.* 2002; **44**:441-454.

Chua JJ, Bhuvanankantham R, Chow VT, Ng ML. Recombinant non-structural 1 (NS1) protein of dengue-2 virus interacts with human STAT3beta protein. *Virus Res.* 2005; **112**:85-94.

Chungue E, Poli L, Roche C, Gestas P, Glaziou P, Markoff LJ. Correlation between detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection. *J.Infect.Dis.* 1994; **170**:1304-1307.

Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J.Virol.* 2006; **80**:11418-11431.

Croen KD. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J.Clin.Invest.* 1993; **91**:2446-2452.

Darnell Jr., JE, Kerr, IM, Stark, GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994; **264**:1415–1421.

Deen JL, Harris E, Wills B *et al*. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*. 2006; **368**:170-173.

Decker, T, Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Muller, M., Kovarik, P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest*. 2002; **109**, 1271–1277.

Derynck R, Leung DW, Gray PW, Goeddel DV. Human interferon gamma is encoded by a single class of mRNA. *Nucleic Acids Res*. 1982; **10**:3605-3615.

Di Silvio M, Geller DA, Gross SS *et al*. Inducible nitric oxide synthase activity in hepatocytes is dependent on the coinduction of tetrahydrobiopterin synthesis. *Adv.Exp.Med.Biol*. 1993; **338**:305-308.

Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S *et al*. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science*. 1991; **252**:698-702.

Eizirik DL, Flodstrom M, Karlens AE, Welsh N. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 1996; **39**:875-890.

Erfan, E., M. Sadikin A, Prijanti R, Soebandrio A. Detection of anti-thrombocyte autoantibody in sera of dengue hemorrhagic fever patients. *J. Clin. Virol*. 2003**28**:S65–S65.

Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch.Virol.* 1997; **142**:897-916.

Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 1993; **11**:571-611.

Feng CG, Kaviratne M, Rothfuchs AG *et al.* NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2006; **177**:7086-7093.

Fountoulakis M, Zulauf M, Lustig A, Garotta G. Stoichiometry of interaction between interferon gamma and its receptor. *Eur.J.Biochem.* 1992; **208**:781-787.

Germi R, Crance JM, Garin D *et al.* Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 2002; **292**:162-168.

Gil MP, Bohn E, *et al.* Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; **98**:6680– 6685.

Green S, Vaughn DW, Kalayanaroj S *et al.* Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J.Med.Virol.* 1999a; **59**:329-334.

Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW *et al.* Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J.Infect.Dis.* 1999b; **180**:1429-1435.

Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 2006; **19**:429-436.

Greenlund AC, Wenner CA, Schreiber RD. Analysis of IFN- receptor binding to IFN- . *J. Interferon Res.* 1992; **12**:103.

Greenlund AC, Schreiber RD, Goeddel DV, Pennica D. Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells. *J.Biol.Chem.* 1993; **268**:18103-18110.

Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J.* 1994; **13**:1591-1600.

Greenlund AC, Morales MO, Viviano BL, Yan H, Krolewski J, Schreiber RD. Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity.* 1995; **2**:677-687.

Gubler DJ. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Clin. Micro. Rev.* 1998; **11**: 480–496.

Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J.Biol.Med.* 1970; **42**:350-362.

Halstead SB. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J.Infect.Dis.* 1979; **140**:527-533.

Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull. World Health Organ* 1980; **58**:1-21.

Halstead SB. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Rev. Infect. Dis.* 1989; **11 Suppl 4**:S830-S839.

Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv. Virus Res.* 2003; **60**:421-467.

Harris EE, Videira L, Perez E *et Al.*. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; **63**:5-11.

Hayes EB, Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1992; **11**:311-317.

Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE, Jr. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 1995; **267**:1347-1349.

Hober D, Poli L, Roblin B *et al.* Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; **48**:324-331.

Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.* 2003; **3**:19-28.

Hsieh MF, Lai SL, Chen JP *et al.* Both CXCR3 and CXCL10/IFN-inducible protein 10 are required for resistance to primary infection by dengue virus. *J.Immunol.* 2006; **177**:1855-1863.

Huang S, Hendriks W, Althage A *et al.* Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 1993; **259**:1742-1745.

Huang KJ, Li SY, Chen SC *et al.* . Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J.Gen.Virol.* 2000; **81**:2177-2182.

Igarashi K, Garotta G, Ozmen L *et al.* Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J.Biol.Chem.* 1994; **269**:14333-14336.

Isaacs, A., Lindermann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1957; **147**, 258–267.

Iyngkaran N, Yadav M, Sinniah M. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. *Singapore Med. J.* 1995; **36**:218-21

Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch.Virol.* 2004; **149**:915-927.

Kamijo R, Le J, Shapiro D *et al.* Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with Bacillus Calmette-Guerin and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* 1993; **178**:1435-1440.

Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 1993; **261**:1445-1448.

Kawahara K, Gotoh T, Oyadomari S *et al.* Co-induction of argininosuccinate synthetase, cationic amino acid transporter-2, and nitric oxide synthase in activated murine microglial cells. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 2001; **90**:165-173.

King AD, Nisalak A, Kalayanrooj S *et al.* B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health* 1999; **30**:718-728.

Kurane I, Rothman AL, Livingston PG *et al.* Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch.Virol.Suppl* 1994; **9**:59-64.

Lee YR, Liu MT, Lei HY *et al.* MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J.Gen.Virol.* 2006; **87**:3623-3630.

Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol.Today* 1990; **11**:97-101.

Libraty DH, Endy TP, Houg HS *et al.* Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J.Infect.Dis.* 2002; **185**:1213-1221.

Lin CF, Lei HY, Shiau AL *et al.* . Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J.Med.Virol.* 2003; **69**:82-90.

Lin YS, Lin CF, Lei HY *et al.* Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. *Curr.Pharm.Des* 2004; **10**:213-221.

Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL *et al.* Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J.Immunol.* 2005; **174** :395-403.

Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I *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.* 2005; **280**:23698-23708.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu.Rev.Immunol.* 1997; **15**:323-350.

Mangada MM, Ennis FA, Rothman AL. Quantitation of dengue virus specific CD4+ T cells by intracellular cytokine staining. *J.Immunol.Methods* 2004; **284**:89-97.

Malasit P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health* 1987; **18**:316-320.

Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig.Dis.Sci.* 2004; **49**:1359-1377.

Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 1994; **79**:1137-1146

Markoff LJ, Innis BL, Houghten R, Henchal LS. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J.Infect.Dis.* 1991; **164**:294-301.

Matos IM, Souza DG, Seabra DG, Freire-Maia L, Teixeira MM. Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 1999; **376**:293-300.

Matsumoto, M, Tanaka, N, Harada, H, Kimura, T, Yokochi, T, Kitagawa, M, Schindler, C, Taniguchi, T. Activation of the transcription factor ISGF3 by interferon-gamma. *Biol. Chem.* 1999; **380**:699-703.

Messer WB, Vitarana UT, Sivananthan K *et al.* Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2002; **66**:765-773.

Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, De Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg.Infect.Dis.* 2003; **9**:800-809.

Meurs, E., Chong, K *et al.*, Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 1990; **62**, 379–390.

Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994; **91**:2395-2400.

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat.Med.* 2003; **9**:921-927.

Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W *et al.* T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J.Immunol.* 2006; **176**:3821-3829.

Morens DM. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clin.Infect.Dis.* 1994; **19**:500-512.

Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir. Res.* 2006; **7**:125.

Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003; **100**:14333-14338.

Nathan, CF, Murray, HW, Wiebe, ME, Rubin, BY. Identification of interferon-gamma as a lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 1983; **158**:670-689.

Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A *et al.* Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 2003; **4**:723-728.

Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM *et al.* Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC.Infect.Dis.* 2005; **5**:64.

Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL *et al.* Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J.Infect.Dis.* 2004; **189**:221-232.

Nisalak, A., T. P. Endy, S. Nimmannitya, S *et al.* Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; **68**:191–202.

Paludan, SR. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand. J. Immunol.* 1998; **48**:459-468.

Paludan SR, Ellermann-Eriksen S, Mogensen SC. NF-kappaB activation is responsible for the synergistic effect of herpes simplex virus type 2 infection on interferon-gamma-induced nitric oxide production in macrophages. *J.Gen.Virol.* 1998; **79 (Pt 11)**:2785-2793.

Nussler AK, Billiar TR, Liu ZZ, Morris SM, Jr. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. *J.Biol.Chem.* 1994; **269**:1257-1261.

Pearl JE, Saunders B, Ehlers S, Orme IM, Cooper AM. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse. *Cell Immunol.* 2001; **211**:43-50.

Petranyi GG. The complexity of immune and alloimmune response. *Transpl Immunol.* 2002; **10**:91-100.

Pinto LM, Oliveira SA, Braga EL, Nogueira RM, Kubelka CF. Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 1999; **94**:387-394.

Rachman A, Rinaldi I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. *Acta Med Indones.* 2006; **38**:105-108.

Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al Sayer H *et al.* Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J.Med.Virol.* 1998; **56**:280-285.

Reyes-Del Valle J, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J.Virol.* 2005; **79**:4557-4567.

Rigau-Pérez JG. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; **59**:272-4.

Rigau-Pérez JG. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet. Infect. Dis.* 2006; **6**:297-302.

Rinderknecht E, O'Connor BH, Rodriguez H. Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J.Biol.Chem.* 1984; **259**:6790-6797.

Rollins BJ., Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine- activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Pathol.* 1990; **136**:1229–1233.

Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv.Virus Res.* 2003; **60**:397-419.

Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1977; **26**:337-343.

Saito M, Oishi K, Inoue S *et al.* Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin.Exp.Immunol.* 2004; **138**:299-303.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J.Leukoc.Biol.* 2004; **75**:163-189.

Scott RM, Nisalak A, Cheamudon U, Seridhoranakul S, Nimmannitya S. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *J.Infect.Dis.* 1980; **141**:1-6.

Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J.Virol.* 2004; **78**:2701-2710.

Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Snider HM, Beatty PR, Harris E. Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J.Immunol.* 2005; **175**:3946-3954.

Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J.Virol.* 2006; **80**:10208-10217.

Simmons CP, Dong T, Chau NV *et al.* Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *J.Virol.* 2005; **79**:5665-5675.

Sommers MS. The cellular basis of septic shock. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2003;**15**:13-25.

Souza DG, Cara DC *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.* 2000a; **131**:1800-1808,.

Souza DG, Coutinho SF, Silveira MR, Cara DC, Teixeira MM. 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.* 2000b **403**:21-28.

Stark, GR, Kerr, IM, Williams, BR, Silverman, RH, Schreiber, RD. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; **67**: 227-264.

Subramaniam PS, Torres BA, Johnson HM. So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine* 2001; **15**:175-187.

Sun K, Salmon SL, Lotz SA, Metzger DW. Interleukin-12 promotes gamma interferon-dependent neutrophil recruitment in the lung and improves protection against respiratory *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun.* 2007; **75**:1196-1202.

Suzuki, Y., Orellana, M. A., Schreiber, R. D., Remington, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988; **240**, 516–518.

Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J.Gen.Virol.* 2006; **87**:3003-3011.

Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J.Gen.Virol.* 2004; **85**:1801-1813.

Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A *et al.* DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J.Exp.Med.* 2003; **197**:823-829.

Taub DD, Lloyd AR, Conlon K *et al.*. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J. Exp. Med.* 1993; **177**:1809–1814.

Theofilopoulos AN, Brandt WE, Russell PK, Dixon FT. Replication of dengue-2 virus in cultured human lymphoblastoid cells and subpopulations of human peripheral leukocytes. *J Immunol.* 1976; **117**:953-961.

Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* 2007; **117**:289-296.

Valente G, Ozmen L, Novelli F *et al.* Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. *Eur.J.Immunol.* 1992; **22**:2403-2412.

Valle, JRD, Chavez-Salinas S, Medina F, del Angel R.M. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol.* 2005; **79**:4557–4567.

van den Broek MF, Muller U, Huang S, Aguet M, Zinkernagel RM. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J.Virol.* 1995; **69**:4792-4796.

Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med.J.* 1991; **36**:63-65.

Walter MR. Three-dimensional models of interferon-alpha subtypes IFN-con1, IFN-alpha8, and IFN-alpha1 derived from the crystal structure of IFN-alpha2b. *Semin.Oncol.* 1997; **24**:S9.

Watts DM, Porter KR, Putvatana P *et al.* Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1999; **354**:1431-1434.

Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat.Rev.Microbiol.* 2007; **5**:518-528.

WHO. Impact of Dengue. Disponível em <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/em/index.html>>. Acesso em 25.jul. 2007.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983; **16**:109-110.

Zivna I, Green S, Vaughn DW *et al.* T cell responses to an HLA-B*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *J.Immunol.* 2002; **168**:5959-5965.