

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Biogênese e função dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo vírus dengue

Giselle Barbosa de Lima

Orientadoras: Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza

Prof. Dra. Andrea Thompson Da Poian

RIO DE JANEIRO

Fevereiro, 2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

L732

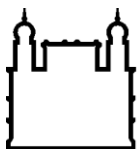
Lima, Giselle Barbosa de.

Biogênese e função dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo vírus dengue. / Giselle Barbosa de Lima. – Rio de Janeiro, 2011.
xvii, 113 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.
Bibliografia: f. 69-87

1. Dengue. 2. Corpúsculos lipídicos. 3. Metabolismo lipídico. 4. Inflamação. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

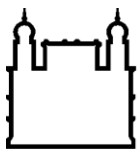
GISELLE BARBOSA DE LIMA

**BIOGÊNESE E FUNÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NA INFECCÃO PELO
VÍRUS DENGUE**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadoras: Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza
Prof. Dra. Andrea Thompson Da Poian

RIO DE JANEIRO
Fevereiro, 2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: GISELLE BARBOSA DE LIMA

**BIOGÊNESE E FUNÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NA INFECÇÃO PELO
VÍRUS DENGUE**

ORIENTADORAS: Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza
Prof. Dra. Andrea Thompson Da Poian

Aprovada em: 24 / 02 / 2011

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Ada Maria de Barcelos Alves (Presidente)
Prof. Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Jr
Prof. Dra. Patrícia Pacheco da Silva
Prof. Dra. Adriana Lima Vallochi (Revisora e suplente)
Prof. Dra. Luciana Barros de Arruda Hinds (Suplente)

Rio de Janeiro, 24 de fevereiro de 2011

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
Rita e César, e à minha avó, Terezinha.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por esta oportunidade e por todas as realizações obtidas até hoje. Senhor, obrigada por proporcionar e abençoar este momento tão especial e feliz para mim e minha família!

Às minhas orientadoras, Patrícia e Andrea, exemplos de competência e dedicação, pelo apoio, paciência, incentivo, entusiasmo e carinho durante todo este período. São estas qualidades que resumem o prazer de fazer parte dos seus grupos de trabalho. Obrigada pela confiança e contribuição no meu amadurecimento profissional!

À Dra. Patrícia Pacheco, pela amizade, preocupação, carinho e, especialmente, por ter me iniciado no meio científico. Obrigada por ter acreditado em mim e dedicado parte do seu tempo para promover o meu crescimento profissional!

À Dra. Clarissa Maya-Monteiro, pelos ensinamentos, ajudas, discussões científicas (ou não), apoio e broncas. Não tenho dúvidas que a sua contribuição foi muito importante para eu conseguir atingir o meu objetivo. Obrigada!

À Dra. Iranaiia Miranda, pelas contribuições essenciais para o andamento deste trabalho. Obrigada por sua alegria, boa vontade e também pela amizade, ensinamentos e ajudas!

À Dra. Adriana Vallochi, à Dra. Cecília Almeida, à Dra. Adriana Ribeiro, ao Dr. Valber Frutuoso e ao Dr. Fernando Bozza pelas idéias, discussões, bem como pelo incentivo e companheirismo no desenvolvimento desta dissertação.

Ao Dr. Hugo Caire Castro-Faria-Neto, por ter me recebido no laboratório em 2005 e, desde então, por ter contribuído com brilhantes idéias e discussões importantes para o meu crescimento científico.

À Narayana, pelas conversas sinceras, conselhos, ajudas nos momentos de tensão (ou não) e também pelo seu jeitinho carinhoso comigo. Obrigada por ser uma amiga tão querida e especial!

À Nati, por ser uma pessoa estressada tanto quanto eu e, portanto, sempre entender os

meus momentos! Obrigada pelas conversas, conselhos e pela grande amizade!

À Rose, por ser uma amiga tão querida e solidária. Obrigada pelo seu bom humor, carinho, apoio e por ser tão eficiente no trabalho!

Ao Edson, por estar sempre disposto a ajudar, por ser uma pessoa incrível, pela amizade e caronas (rs)!

Ao grupo corpúsculos lipídicos, pelas ajudas em diversas técnicas, união, parceria, discussões produtivas, apoio e, especialmente, por uma ótima convivência.

A todos do Laboratório de Imunofarmacologia, pelo apoio, discussões, idéias, incentivo, ajudas e amizade.

A todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica de Vírus da UFRJ, por terem me recebido sem grandes resistências, pela paciência e ajudas durante todo este período. Leandro, muitíssimo obrigada pela sua disposição em sempre ajudar, pelo seu humor contagiante, conversas e apoio!

À Dra. Andrea Gamarnik e ao Marcelo Samsa, do laboratório de Virologia Molecular da *Fundación Instituto Leloir* (Argentina), pela colaboração que resultou na publicação do primeiro artigo sobre dengue e corpúsculos lipídicos!

Aos funcionários da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, especialmente à Daniele Lobato, pela atenção e boa vontade demonstrada ao longo do curso.

Às agências de fomento, CNPq, FAPERJ, PAPES-FIOCRUZ, INCT-Dengue e Pronex-Dengue.

Aos meus amigos e familiares que sempre torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram para o andamento deste trabalho.

Às amigas Cris e Sally, pela amizade verdadeira e pelos momentos inesquecíveis desde os tempos de faculdade. Obrigada pelas muitas risadas, conversas, conselhos, broncas, carinho e sinceridade! Sei que a nossa amizade é para sempre e sou muito grata por vocês

fazerem parte da minha vida!

À minha afilhada, Júlia, por ser a criança mais especial da minha vida e proporcionar momentos tão alegres e inesquecíveis! Obrigada por ter compreendido, mesmo que com cinco aninhos de idade, a minha ausência durante este período tenso! A dinda te ama muito!

Ao meu namorado, Thiago, pelo amor, companheirismo, por ser esta pessoa admirável e tornar os meus dias mais felizes. Obrigada pela paciência, compreensão e sua boa vontade em sempre me ajudar. Amo você, meu amor!

À minha avó, Terezinha, por ser um exemplo em minha vida. Obrigada por sempre estar ao meu lado, pelo seu amor e por confiar em mim independente de qualquer coisa! Te amo, vó!

Ao meu amado irmão, Fernando, por me aguentar (ou não) nos momentos de pura tensão!

Finalmente, aos meus pais, Rita e César, pelo amor, dedicação, confiança, apoio e incentivo durante toda a minha jornada estudantil. Obrigada pelos reconhecidos esforços a fim de oferecer o alicerce necessário para me tornar o que eu sou hoje! Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida, amo vocês!

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e de repente estará fazendo o impossível”

São Francisco de Assis

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ACSL	do inglês <i>Long-chain acyl-coenzyme A synthetase</i>
ADE	do inglês <i>Antibody Dependent Enhancement</i> (amplificação dependente de anticorpos)
ADRP	Proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos
AO	Ácido oléico
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BiP	do inglês <i>Immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
BSA	Albumina do soro bovino
C	Proteína do capsídeo
CCR	do inglês <i>Chemokine (C-C motif) Receptor</i>
CD	do inglês <i>Cluster of differentiation</i>
CLEC5A	do inglês <i>C-type lectin domain family 5, member A</i>
COX	Ciclooxigenase
cPLA ₂	Fosfolipase A ₂ citosólica
CXCR	do inglês <i>Chemokine (C-X-C motif) Receptor</i>
DC-SIGN	do inglês <i>Dendritic-Cell Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin</i>
DENV	Vírus dengue
DENVi	Vírus dengue inativado
DENV-R	Vírus dengue carregando o gene reporter luciferase
E	Glicoproteína do envelope
EIA	do inglês <i>Enzyme Immunoassay</i> (ensaio imunoenzimático)
ELISA	do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
Fc	do inglês <i>Fragment crystallizable region</i>
FcγR	Receptor para Fc gama de IgG
FD	Febre da Dengue
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
GM-CSF	do inglês <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos)
GRP	do inglês <i>Glucose Regulated Protein</i>

HBSS	do inglês <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCV	Vírus da hepatite C
hMIF	MIF humano
HRP	do inglês <i>Horseradish Peroxidase</i>
ICAM	do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule</i> (molécula de adesão intercelular)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
LO	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
Luc	Luciferase
LXR	do inglês <i>Liver X Receptor</i>
M	Proteína de membrana
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MBL	do inglês <i>Mannose-Binding Lectin</i>
MCP-1	do inglês <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> (proteína quimiotática de monócitos do tipo 1)
MDA	do inglês <i>Melanoma Differentiation-Associated Gene 5</i>
MIF	do inglês <i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i> (fator inibidor da migração de macrófagos)
MIP	do inglês <i>Macrophage Inflammatory Protein</i> (proteína inflamatória de macrófagos)
MOI	Multiplicidade de infecção
MS	Ministério da Saúde
MVD	do inglês <i>Mevalonate Diphospho Decarboxylase</i> (Mevalonato difosfato descarboxilase)
MYD88	do inglês <i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
NK	do inglês <i>Natural Killer</i>
NS	Proteína não estrutural
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
ORF	do inglês <i>Open Reading Frame</i> (fase aberta de leitura)
ORO	do inglês <i>Oil Red O</i>

PAF	do inglês <i>Platelet Activating Factor</i> (fator de ativação plaquetária)
PAFR	Receptor do PAF
PAT	<u>P</u> erilipina, <u>A</u> dipofilina, <u>T</u> IP47
PBMC	do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (células mononucleares do sangue periférico)
PBS	do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFU	Unidade formadora de placa
PG	Prostaglandina
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PPAR	do inglês <i>Peroxisome-proliferator-activated receptor</i>
prM	Glicoproteína precursora da proteína de membrana
RANTES	Regulada sob ativação, normalmente expressa e secretada por células T
RC	Complexo de replicação
RIG-I	do inglês <i>Retinoic Acid-Inducible Gene-I</i>
RNAse	Ribonuclease
RT-PCR	do inglês <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SCD	Síndrome de Choque da Dengue
SFB	Soro fetal bovino
SP	Peptidase sinal
SPP	Peptidase do peptídeo sinal
SREBP	do inglês <i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TDR	do inglês <i>Training in Tropical Diseases</i>
THP-1	do inglês <i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>
TIP47	Proteína de interação de porção terminal de 47 kDa
TLR	do inglês <i>Toll Like Receptor</i> (receptor do tipo <i>Toll</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

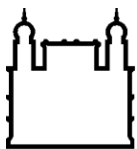
Figura 1.1. Estrutura do vírus dengue	3
Figura 1.2. Organização do genoma do vírus dengue	3
Figura 1.3. Topologia e sítios de clivagem da poliproteína do vírus dengue na membrana do retículo endoplasmático	5
Figura 1.4. Ciclo de replicação do vírus dengue	6
Figura 1.5. Distribuição global da dengue em 2010	9
Figura 1.6. Corpúsculos lipídicos em macrófagos ativados	20
Figura 1.7. Modelo proposto para explicar o papel dos corpúsculos lipídicos na produção do HCV	24
Figura 2.1. Representação esquemática do DENV-R	32
Figura 4.1. Imagem de leucócitos isolados de voluntários sadios ou pacientes com FHD	40
Figura 4.2. Análise quantitativa de corpúsculos lipídicos em leucócitos isolados de pacientes com FHD e voluntários sadios	41
Figura 4.3. Imagem de células HepG2 infectadas ou não pelo DENV-3 <i>in vitro</i>	42
Figura 4.4. Efeito do DENV-3 na formação de corpúsculos lipídicos <i>in vitro</i>	43
Figura 4.5. Efeito do DENV-2 na formação de corpúsculos lipídicos <i>in vitro</i>	44
Figura 4.6. Localização dos corpúsculos lipídicos e da proteína C do DENV-2 nas células BHK-21	46
Figura 4.7. Análise de corpúsculos lipídicos em células infectadas pelo DENV-2 <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de C75	48
Figura 4.8. Análise quantitativa de corpúsculos lipídicos em células BHK-21 infectadas pelo DENV-2 <i>in vitro</i> e tratadas com diferentes concentrações de triacsin C	49
Figura 4.9. Efeito do C75 sobre a replicação do DENV-2	51
Figura 4.10. Efeito do triacsin C sobre a replicação do DENV-2	52
Figura 4.11: Localização subcelular do MIF em leucócitos isolados de pacientes com FHD.	53
Figura 4.12. MIF é estocado nos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo DENV	54
Figura 4.13. O DENV-3 induz a formação de corpúsculos lipídicos e a geração de PGE2 em macrófagos humanos <i>in vitro</i>	55
Figura 5.1. Modelo proposto para biogênese e função dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo vírus dengue	65

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	ix
Lista de figuras	xii
Resumo	xvi
Abstract	xvii
Capítulo 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. Dengue	2
1.1.1. Taxonomia e etiologia	2
1.1.2. Estrutura do vírus dengue	2
1.1.3. Ciclo de replicação	4
1.1.4. Transmissão	6
1.1.5. Aspectos epidemiológicos	7
1.1.5.1. Dengue no Brasil	9
1.1.6. Manifestações clínicas	11
1.1.7. Imunopatogênese	11
1.1.7.1. Fatores virais	12
1.1.7.2. Fatores do hospedeiro	13
1.1.8. Prevenção e controle	17
1.2. Corpúsculos lipídicos	19
1.2.1. Características gerais, composição e funções	19
1.2.2. Biogênese	22
1.2.3. Envolvimento dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo vírus da hepatite C ...	23
Capítulo 2: OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
Capítulo 3: MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Voluntários	29
3.2. Cultura de células	29
3.3. Preparo dos estoques virais	30
3.4. Titulação dos vírus	30
3.5. Inativação viral por aquecimento	30
3.6. Cultura de células e infecção com os vírus dengue <i>in vitro</i>	31
3.7. Tratamentos com inibidores do metabolismo lipídico	31
3.8. Infecção com o vírus reporter e análise da atividade da luciferase	32

3.9. PCR em tempo real	33
3.10. Coloração e enumeração dos corpúsculos lipídicos	33
3.10.1. Por tetróxido de ósmio	33
3.10.2. Por oil red O	34
3.10.3. Por sonda lipídica fluorescente (BODIPY)	34
3.11. Ensaio de imunolocalização	35
3.11.1. Imunolocalização da proteína C associada à incorporação de sonda lipídica fluorescente	35
3.11.2. Imunolocalização do MIF associada à incorporação de sonda lipídica fluorescente	35
3.12. Ensaio de imunocitoquímica	36
3.13. Isolamento de corpúsculos lipídicos por fracionamento subcelular	36
3.14. Western blotting	37
3.15. Dosagem de PGE ₂	37
3.16. Análise estatística	38
3.17. Considerações sobre aspectos éticos	38
Capítulo 4: RESULTADOS	39
4.1. Leucócitos de pacientes com FHD apresentam aumento na formação de corpúsculos lipídicos	40
4.2. O DENV-3, mas não o DENV-3 inativado, induz a formação de corpúsculos lipídicos <i>in vitro</i>	42
4.3. O DENV-2, mas não o DENV-2 inativado, induz a formação de corpúsculos lipídicos <i>in vitro</i>	44
4.4. A proteína do capsídeo do DENV-2 trafega para os corpúsculos lipídicos	45
4.5. A formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 é bloqueada por inibidores do metabolismo lipídico	47
4.6. A inibição da formação de corpúsculos lipídicos tem impacto na capacidade replicativa do DENV-2	50
4.7. MIF em leucócitos de pacientes com FHD é estocado num padrão citoplasmático sugestivo de localização nos corpúsculos lipídicos	53
4.8. O DENV-3 induz a compartimentalização do MIF nos corpúsculos lipídicos de macrófagos humanos	54
4.9. O DENV-3 induz aumento na formação de corpúsculos lipídicos e na geração de PGE ₂ em macrófagos humanos <i>in vitro</i>	55
Capítulo 5: DISCUSSÃO	56

Capítulo 6: CONCLUSÕES	67
Capítulo 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
Capítulo 8: ANEXOS	88



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

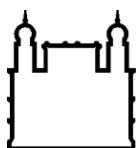
BIOGÊNESE E FUNÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GISELLE BARBOSA DE LIMA

A dengue, em termos de morbidade e mortalidade, é caracterizada como a principal arbovirose humana, sendo responsável pela infecção de milhares de pessoas nas regiões tropical e subtropical do mundo, causando a morte de adultos e crianças. Uma das razões para a ausência de abordagens terapêuticas adequadas se deve ao pouco conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na interação do vírus dengue com as células hospedeiras. No entanto, evidências sugerem que a regulação de diferentes etapas do metabolismo celular desempenhe funções cruciais tanto na replicação viral quanto na resposta do hospedeiro à infecção. Estudos têm demonstrado que o acúmulo intracelular de lipídios em corpúsculos lipídicos – organelas citoplasmáticas dinâmicas e funcionalmente ativas – está associado a doenças de grande relevância para a saúde pública, incluindo a hepatite C. Além disso, foi observado que estas organelas desempenham funções não apenas na replicação do vírus da hepatite C, mas também na produção de partículas infecciosas; entretanto, o envolvimento dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo vírus dengue ainda não foi avaliado. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a formação e função dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo vírus dengue, com foco na interação com proteínas virais, na modulação da capacidade replicativa e/ou infecciosa do vírus e na geração aumentada de mediadores inflamatórios. Nossos resultados demonstraram um aumento no número de corpúsculos lipídicos em leucócitos isolados de pacientes com a forma grave da doença, bem como indução da biogênese destas organelas em diferentes tipos celulares infectados com distintos sorotipos do vírus dengue *in vitro*. A exposição de células ao vírus dengue inativado por aquecimento não promoveu a formação de corpúsculos lipídicos. Em paralelo à indução da formação destas organelas, em células infectadas *in vitro*, observamos um aumento na produção de PGE₂. Adicionalmente, demonstramos que a proteína do capsídeo viral, bem como o MIF – mediador proinflamatório cuja concentração está diretamente correlacionada com a gravidade da doença – se encontravam colocalizados nos corpúsculos lipídicos durante a infecção. Por fim, observamos que a modulação da lipogênese e da formação de corpúsculos lipídicos, através do tratamento das células com as drogas C75 e triacsin C, afetaram a capacidade replicativa do vírus. Desta forma, os nossos resultados indicam que a infecção pelo vírus dengue promove a biogênese de corpúsculos lipídicos de uma maneira dependente das enzimas ácido graxo sintase e acil-CoA sintetase, uma vez que a inibição destas por drogas específicas leva ao bloqueio da formação destas organelas. Esta inibição também promove uma redução na replicação viral, propondo um papel dos corpúsculos lipídicos neste processo. Além disso, o aumento na geração de PGE₂ induzido pelo vírus, bem como a localização do MIF e da proteína do capsídeo viral nestas organelas sugerem que os corpúsculos lipídicos atuam na produção aumentada de mediadores inflamatórios e na regulação temporária do processo viral. Assim, a modulação dos corpúsculos lipídicos pode vir a representar um potencial alvo terapêutico para o tratamento da dengue.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

BIOGÊNESE E FUNÇÃO DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GISELLE BARBOSA DE LIMA

Dengue, in terms of disease and mortality, is characterized as the most important arthropod-borne human viral disease, infecting millions of people in tropical and subtropical regions of the world and being responsible for many deaths in children and adults. The lack of adequate therapeutic approaches for treatment of dengue is a consequence of our limited understanding about the molecular mechanisms that underlie the interaction between dengue virus and human host. However, evidence suggests that the regulation of different steps of cellular metabolism play crucial roles in both viral replication and the host response to infection. Recent studies have shown that intracellular accumulation of lipids within lipid droplets – dynamic and functionally active organelles – is associated with diseases of major relevance to public health, including hepatitis C. Furthermore, it was observed that these organelles play roles not only in hepatitis C virus replication, but also in the production of infectious particles; however the involvement of lipid droplets in dengue virus infection has never been addressed. Therefore, this work aimed to investigate lipid droplets formation and function during dengue virus infection, focusing on interaction with viral proteins, modulation of replication and/or production of infectious virus and increased generation of inflammatory mediators. Our results demonstrated a significant increase in lipid droplets accumulation in leukocytes from dengue hemorrhagic fever patients, as well as induction of biogenesis in different cell types infected with distinct serotypes of dengue virus *in vitro*. Importantly, heat inactivated dengue virus failed to induce lipid droplets formation in cells infected *in vitro*. In paralleled to an increased lipid droplets biogenesis, in cells infected *in vitro*, we observed an increase in PGE₂ generation. Additionally, we also demonstrated that the virus core protein and MIF – proinflammatory mediator whose concentration is directly related to disease severity – co-localizes in lipid droplets during infection. Finally, we observed that modulation of lipogenesis and lipid droplets formation, by treatment of the cells with C75 and triacsin C, impaired dengue virus replication. Thus, our results indicate that dengue virus infection promotes lipid droplets biogenesis and that this event seems to be dependent of the enzymes fatty acid synthase and acyl-CoA synthetase, since specific inhibition of these enzymes blocks the formation of these organelles. This inhibition also leads to decreased viral replication, suggesting a role of lipid droplets in this process. Moreover, the increased production of PGE₂ induced by dengue virus, as well as MIF and virus core protein localization in these organelles propose that lipid droplets are involved in both increased generation of inflammatory mediators as temporary regulation of viral process. So, the modulation of lipid droplets might represent an attractive therapeutic target for dengue.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

1.1.1. Taxonomia e etiologia

A família *Flaviviridae* abrange diversos patógenos virais responsáveis por causar doenças graves e mortes em humanos e animais. Atualmente, esta família consiste de três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus* engloba mais de 70 vírus, incluindo alguns dos mais importantes patógenos humanos como os vírus da dengue, da febre amarela, do oeste do Nilo e da encefalite japonesa (Mukhopadhyay e cols., 2005; Lindenbach e cols., 2007).

O vírus dengue (DENV) é o agente causador da doença e, até o presente momento, foram isolados quatro sorotipos antigenicamente distintos, classificados como DENV-1 a 4. O DENV-1 foi primeiramente isolado durante a Segunda Guerra Mundial, no Pacífico, por investigadores japoneses e americanos. Em seguida, um grupo de pesquisa encontrou uma cepa de vírus proveniente da Nova Guiné, antigenicamente distinta da cepa isolada anteriormente, que, portanto, foi designada como DENV-2. O DENV-3 e DENV-4 foram isolados na década de 50 durante uma epidemia nas Filipinas. Desde então, milhares de vírus provenientes dos trópicos foram isolados, entretanto não foi documentado um novo sorotipo do DENV (Mackenzie e cols., 2004; Gould e Solomon, 2008).

1.1.2. Estrutura do vírus dengue

A estrutura do DENV foi resolvida através de uma combinação das técnicas de microscopia crioeletrônica e cristalografia de raios X. No sobrenadante de células infectadas, o vírus é encontrado como partícula madura (infecciosa) e imatura (não infecciosa) com um diâmetro de aproximadamente 50 e 60 nm, respectivamente. Ambas as partículas são compostas por nucleocapsídeo, que consiste do RNA genômico em conjunto com múltiplas cópias da proteína do capsídeo (C), envolto por uma bicamada lipídica proveniente da célula hospedeira. Possuem em suas superfícies as glicoproteínas E (envelope) e prM (precursora da proteína de membrana) ou proteína M (membrana), que apresentam diferentes conformações nas distintas formas (figura 1.1) (Lindenbach e cols., 2007; Perera e Kuhn, 2008). Durante a infecção, partículas subvirais também são produzidas e apresentam um diâmetro de aproximadamente 32 nm. São constituídas pelas glicoproteína E e proteína M, mas não possuem nucleocapsídeo, sendo, assim, não infecciosas (Mukhopadhyay e cols., 2005; Junjhon e cols., 2008).

O genoma viral consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 11 kb de comprimento. Este codifica uma única fase aberta de leitura

(ORF) flanqueada pelas regiões não codificantes 5' e 3', que são importantes para a amplificação do RNA viral. Na porção terminal da região 5' há uma estrutura cap, porém na região 3', apesar de existir estruturas de RNA conservadas, não há cauda poli-A. O RNA genômico é diretamente utilizado como RNA mensageiro (mRNA) para a síntese da poliproteína precursora (figura 1.2), que é posteriormente clivada, por uma combinação de proteases viral e do hospedeiro, em três proteínas estruturais (C, prM e E), que constituem a partícula viral, e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), envolvidas na replicação e montagem do vírus, bem como na modulação da resposta do hospedeiro (Alvarez e cols., 2005; Lindenbach e cols., 2007; Perera e Kuhn, 2008; Fernandez-Garcia e cols., 2009).

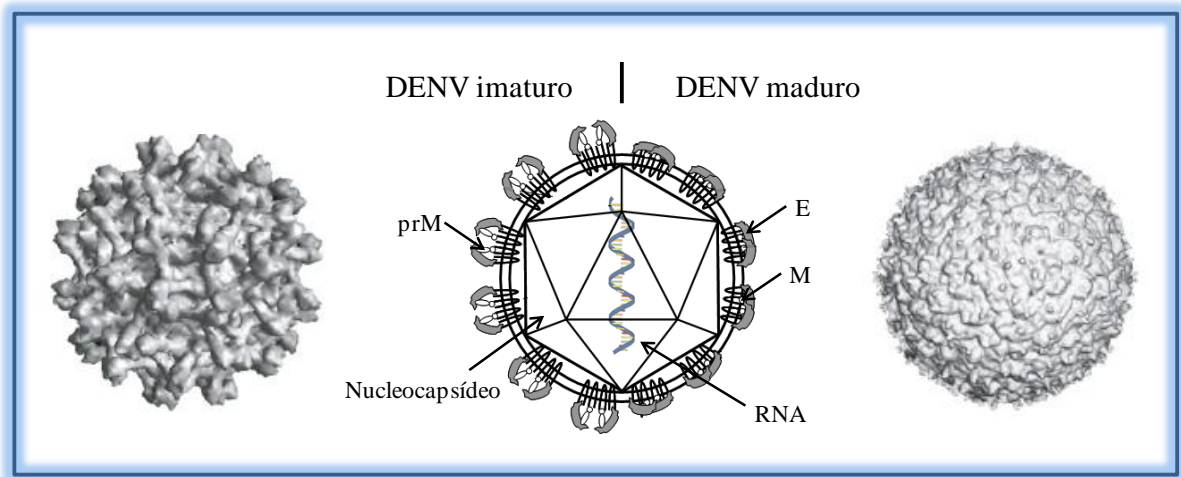


Figura 1.1. Estrutura do vírus dengue. Ao centro, esquema da organização das proteínas tanto na partícula viral imatura quanto na madura (adaptada de Heinz e Allison, 2001). À esquerda, vírus imaturo com projeções e à direita, vírus maduro liso (Perera e Kuhn, 2008).

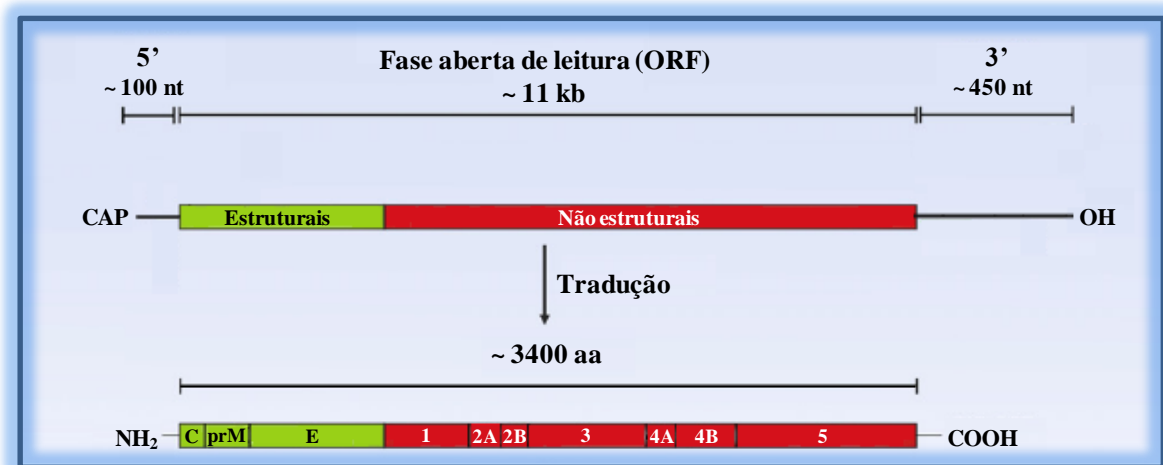


Figura 1.2. Organização do genoma do vírus dengue. A única fase aberta de leitura (ORF), flanqueada pelas regiões não codificantes 5' e 3', codifica uma poliproteína precursora (adaptada de Fernandez-Garcia e cols., 2009).

1.1.3. Ciclo de replicação

O ciclo de replicação inicia-se quando o DENV infecta uma célula hospedeira permissiva (Clyde e cols., 2006). Em estudos realizados com espécimes obtidos de pacientes com dengue observou-se a presença de RNA ou antígenos virais em diversos tecidos e órgãos, incluindo fígado, baço, cérebro, linfonodo, rim, pulmão, coração, medula óssea e pele (Boonpucknavig e cols., 1979; Bhoopat e cols., 1996; Miagostovich e cols., 1997; de Araujo e cols., 2009). O DENV pode infectar uma variedade de tipos celulares *in vivo*, como as células dendríticas, monócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais (Bente e Rico-Hesse, 2006). *In vitro*, o vírus também é capaz de infectar diversas células de mamíferos, e, portanto, algumas linhagens celulares têm sido extensamente utilizadas, tais como as de fibroblastos provenientes de rim de hamster – BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) – e as de hepatócitos derivadas de hepatocarcinoma humano – HepG2 (Henchal e Putnak, 1990; Clyde e cols., 2006).

O primeiro contato entre o vírus e a célula hospedeira se dá através da interação da glicoproteína E com alguns receptores da superfície celular. Evidências sugerem que o receptor DC-SIGN esteja envolvido na infecção de células dendríticas pelo DENV (Navarro-Sanchez e cols., 2003; Tassaneetrithep e cols., 2003). Entretanto, a endocitose mediada por este receptor parece ser dispensável para a replicação viral e propõe-se que o DC-SIGN atue como facilitador da interação do DENV com outro receptor que possa promover a sua internalização (Lozach e cols., 2005). Além deste, tem sido proposto a interação do DENV com outros receptores, incluindo o receptor para manose (Miller e cols., 2008), CLEC5A (Chen e cols., 2008), GRP78 (BiP) (Jindadamrongwech e cols., 2004), bem como moléculas associadas ao CD14 (Chen e cols., 1999).

A internalização do DENV ocorre por endocitose mediada pela rede de clatrin (80%) ou macropinocitose (20%) (Suksanpaisan e cols., 2009). O ambiente ácido do endossoma induz uma mudança conformacional na glicoproteína E, propiciando a fusão entre as membranas viral e da célula hospedeira, o que culmina na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (Mukhopadhyay e cols., 2005; Melo e cols., 2009).

A proteína C dissocia-se do RNA viral e, uma vez no citoplasma da célula, este é traduzido em uma poliproteína precursora. Esta permanece ancorada à membrana do retículo endoplasmático (RE), onde é co e pós-traducionalmente clivada, por proteases viral e do hospedeiro, em três proteínas estruturais e sete não estruturais (figura 1.3) (Mukhopadhyay e cols., 2005; Clyde e cols., 2006).

Após a tradução, a proteína NS5, que age como RNA polimerase dependente de RNA, produz o RNA viral de polaridade negativa, que atua como molde para a síntese de novas

cópias de polaridade positiva. Estas, por sua vez, podem ser empacotadas em partículas virais ou servir como mRNA (Fernandez-Garcia e cols., 2009). A replicação viral ocorre em estruturas de membranas induzidas pelo DENV, conhecidas como complexo de replicação (RC) (Mackenzie e cols., 1996; Grief e cols., 1997; Welsch e cols., 2009). Este é composto por RNA viral, proteínas virais e provavelmente fatores do hospedeiro. Acredita-se que o RC seja eficiente por ancorar a maquinaria de replicação em compartimentos de membrana e/ou por proteger este processo dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

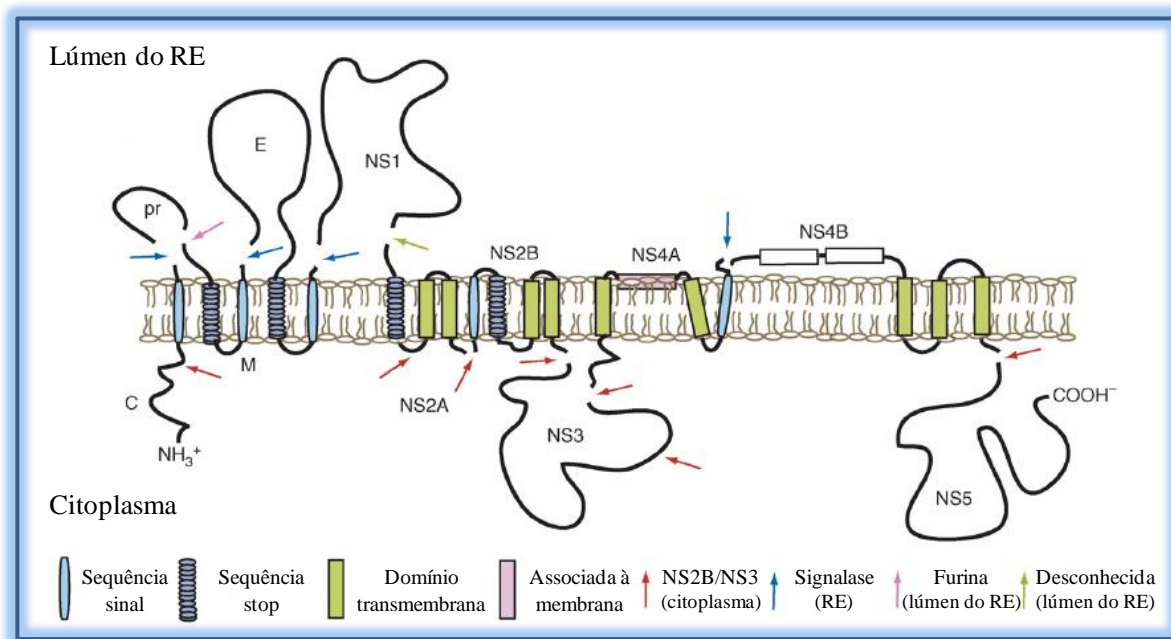


Figura 1.3. Topologia e sítios de clivagem da poliproteína do vírus dengue na membrana do retículo endoplasmático. O RNA viral é traduzido em uma poliproteína precursora que permanece ancorada à membrana do RE, onde é clivada por proteases viral e celulares (setas) originando dez proteínas virais. As glicoproteínas prM e E são liberadas da poliproteína através da ação da sinalase (seta azul) no RE, porém permanecem ancoradas na parte luminal da membrana. A sequência sinal da proteína C é clivada pela serina protease NS3 e seu cofator NS2B (NS2B/NS3) (seta vermelha). Durante a maturação da partícula viral, a glicoproteína prM é processada pela furina (seta rosa), originando o peptídeo pr e a proteína M. As proteínas NS são clivadas principalmente pela protease viral no citoplasma, com exceção da NS1, que é liberada da NS2A por uma protease desconhecida (seta verde) no lúmen do RE. NS2A/2B e NS4A/4B ficam ancoradas no RE como proteínas transmembranares (adaptada de Perera e Kuhn, 2008).

A montagem do vírus ocorre no lúmen do RE. O RNA viral é complexado com múltiplas cópias da proteína C seguido por empacotamento em uma bicamada lipídica derivada do RE, contendo heterodímeros das glicoproteínas prM e E. Após transporte pela via secretória do hospedeiro, a maturação viral se dá na rede trans-Golgi através da clivagem, mediada por

furina, da prM em M. Por fim, as partículas virais são liberadas no meio extracelular por exocitose (Fernandez-Garcia e cols., 2009).

A figura 1.4 representa esquematicamente o ciclo de replicação do DENV.

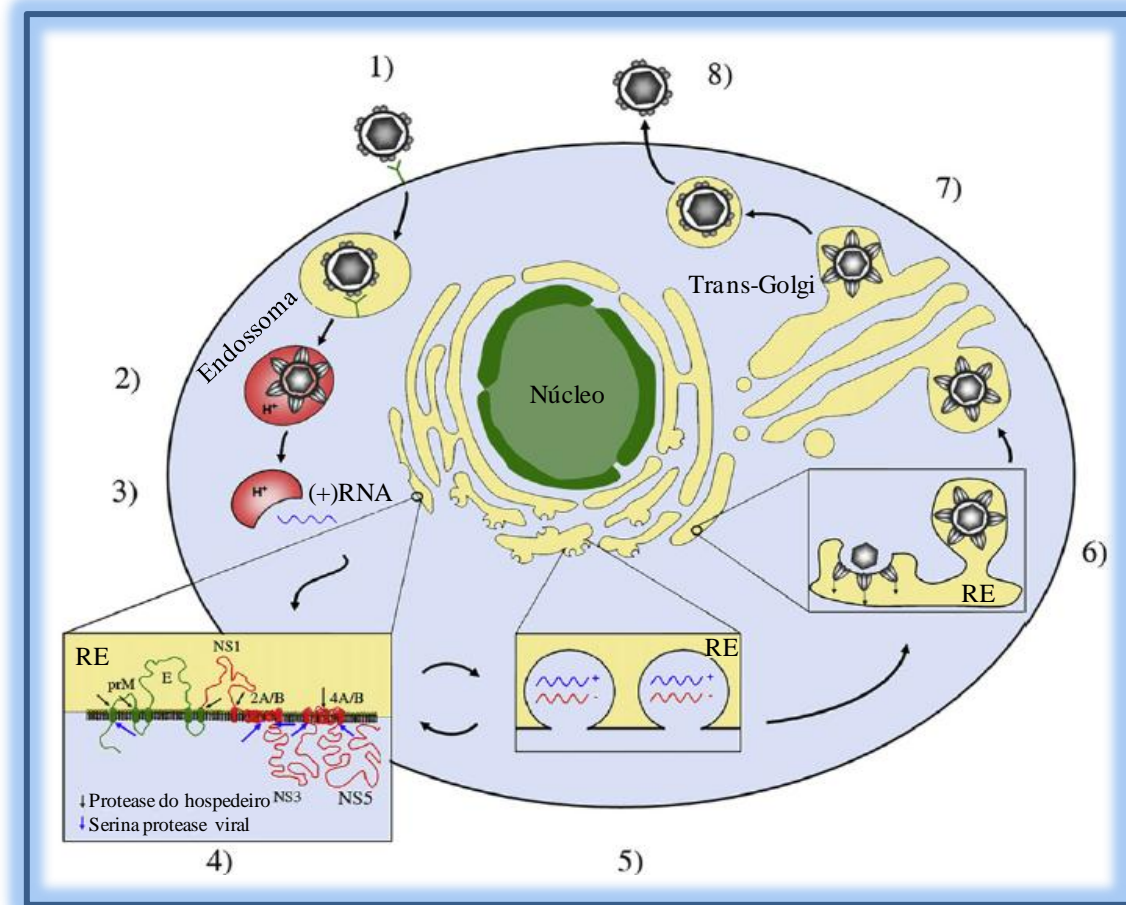


Figura 1.4. Ciclo de replicação do vírus dengue. O DENV é internalizado por endocitose mediada por receptor (1). O ambiente ácido no interior do endossoma induz fusão entre as membranas viral e do hospedeiro (2), resultando na liberação do genoma viral no citoplasma celular (3). A tradução do RNA viral é seguida por processamento da poliproteína precursora através de proteases viral (seta azul) e do hospedeiro (seta preta) (4). Os sítios de clivagem e a topologia das proteínas estruturais (verde) e não estruturais (vermelho), na membrana do RE, estão esquematicamente ilustradas. Após a tradução, o RC é montado em estruturas de membranas induzidas pelo vírus, dando início à replicação do DENV (5). Há a transcrição do RNA (+) em RNA (-), que atua como molde para a síntese de novas cópias de RNA (+). Estas podem servir como mRNA ou ser empacotadas em partículas virais (6). O empacotamento ocorre na superfície do RE seguido por brotamento das proteínas estruturais e RNA (+) no lúmen do RE. Os vírus imaturos resultantes são transportados pelo trans-Golgi, onde a furina medeia a clivagem da prM em M gerando partículas infecciosas maduras (7), que são liberadas por exocitose (8) (adaptada de Fernandez-Garcia e cols., 2009).

1.1.4. Transmissão

Algumas espécies de mosquitos *Aedes*, dependendo da área geográfica, atuam como agentes transmissores da dengue, incluindo *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. polynesiensis* e outros

membros do grupo *A. scutellaris*; e, portanto, o DENV é um arbovírus – termo ecológico utilizado para descrever vírus que requerem artrópodes para completar seus ciclos de vida (Gubler, 1998a,2002b).

Existem dois ciclos de transmissão do DENV, o ciclo urbano e o silvestre. O ciclo urbano envolve os humanos, que atuam como hospedeiros reservatórios e amplificadores, e geralmente os mosquitos *A. aegypti* como vetores. O *A. aegypti* é antropofílico, extremamente adaptado ao ambiente urbano, possui ampla distribuição geográfica e está estabelecido em virtualmente todos os países tropicais. O *A. albopictus* é considerado vetor secundário no sudeste asiático, oeste do Pacífico, Américas do Sul e Central. Embora aquele desempenhe o papel mais importante na transmissão urbana, este e outras espécies secundárias podem ser mais suscetíveis às infecções experimentais e em algumas áreas, os vetores mais importantes (Ali e cols., 2003; Halstead, 2008; Kyle e Harris, 2008; Weaver e Vasilakis, 2009).

O ciclo silvestre ocorre nas florestas do sudeste asiático e do oeste africano, entre primatas não humanos e, na maioria dos casos, mosquitos *A. albopictus* (Kyle e Harris, 2008). Por ser um vírus completamente adaptado aos humanos, o DENV, ao contrário da maioria dos arbovírus, perdeu a necessidade do ciclo silvestre para a manutenção de epidemias (Mackenzie e cols., 2004).

Para que haja transmissão, a fêmea do mosquito *Aedes* spp. deve picar um indivíduo infectado durante a fase virêmica da doença. Após o repasto sanguíneo, ocorre o período de incubação extrínseco, com duração de 8-12 dias, tornando o mosquito infectado e, portanto, transmissor do DENV (McBride e Bielefeldt-Ohmann, 2000). Este se mantém infectado por toda a sua vida (TDR e WHO, 2009). Por consequência, ao picar um indivíduo saudável ocorre a infecção do mesmo, promovendo o período de incubação intrínseco com duração média de 4,5-7 dias (Halstead, 2008). O ciclo se repete quando mosquitos não infectados se alimentam de um indivíduo nesta fase.

1.1.5. Aspectos epidemiológicos

As primeiras epidemias de uma doença semelhante à dengue foram documentadas na Ásia, África e América do Norte em 1779-1780, quando a indústria naval e o comércio estavam em expansão. A partir daí, as epidemias de dengue ocorreram em intervalos longos, de 10 a 40 anos, uma vez que a principal forma de transporte de vetores e vírus, entre os centros populacionais, se dava através das embarcações a vela. A introdução de novas cepas virais e sorotipos era rara, refletindo na baixa frequência das epidemias (Gubler, 1998a,2002a). Contudo, um novo padrão endêmico da doença, acompanhado pelo aumento na incidência de casos graves, surgiu no sudeste asiático, após a Segunda Guerra Mundial

(Henchal e Putnak, 1990). As alterações ecológicas decorrentes do pós-guerra contribuíram para a disseminação tanto do *A. aegypti* quanto do DENV, favorecendo a ressurgência de epidemias em diversos países desta região nas décadas de 50 e 60. Na década de 70, o desenvolvimento econômico associado ao crescimento populacional, à urbanização descontrolada e à falta de controle efetivo do vetor foram importantes na dispersão da doença por todo o sudeste da Ásia (Wilder-Smith e Gubler, 2008). A circulação de mais de um sorotipo na Ásia em conjunto ao intenso movimento de pessoas infectadas através de viagens aéreas internacionais, propiciaram a distribuição do vírus e mosquito, durante as décadas de 70 e 80, para as ilhas do Pacífico e América tropical (Gubler, 1998b).

Nas décadas de 50 e 60, a maioria dos países da América do Sul e Central adotaram campanhas de erradicação do mosquito *A. aegypti*. Estas foram coordenadas pela Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), que embora dirigidas para o controle da febre amarela, proporcionaram também a eliminação da dengue. Porém, na década de 70, devido ao surgimento de outras prioridades e à redução de recursos, o programa de erradicação foi interrompido e essa espécie voltou a infestar a maioria desses países tropicais. Apesar das mudanças epidemiológicas terem sido mais dramáticas nas Américas, o número de casos da doença também aumentou nas ilhas do Pacífico e Caribe. Este aumento foi seguido pelo surgimento de epidemias e formas graves, além de hiperendemicidade (Gubler, 1998a,b; Mackenzie e cols., 2004; Schatzmayr e Cabral, 2009).

Como consequência desse quadro, a dengue é considerada hoje uma das principais doenças infecciosas em termos de morbidade e mortalidade (Guzman e Kouri, 2002). Atualmente, cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas onde há risco de transmissão, que ocorre nas regiões tropical e subtropical do mundo (figura 1.5), predominantemente em áreas urbanas e semi-urbanas. Estima-se que 50 milhões de infecções, com 500.000 casos de formas graves da doença, ocorram em mais de 100 países ocasionando 22.000 mortes anualmente (WHO, 2009). Apesar de menos de 10% dos casos sintomáticos de dengue ser notificado e cerca de 50-90% das infecções serem assintomáticas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou a dengue como a principal arbovirose humana (WHO, 1997; Kyle e Harris, 2008).



Figura 1.5. Distribuição global da dengue em 2010. (Adaptada de WHO, 2010 (<http://www.who.int/ith/en/>)).

1.1.5.1. Dengue no Brasil

Com a disseminação do DENV pela América tropical e a reinfestação do Brasil pelo *A. aegypti* em 1977, houve a reintrodução do vírus no país na década de 80. A partir de então, mais de 60% dos casos de dengue reportados nas Américas ocorreram no Brasil (Nogueira e cols., 2007).

O relato mais antigo de uma doença clinicamente compatível com a dengue foi em 1846, no Rio de Janeiro. Casos da doença foram descritos em Curitiba (PR) e no estado do Rio Grande do Sul, em 1917; no Rio de Janeiro, em 1922; e em Niterói (RJ), em 1923. No entanto, o primeiro surto de dengue documentado ocorreu em Boa Vista (RR), nos anos de 1981 e 1982, na qual os sorotipos 1 e 4 foram isolados de pacientes e vetores. Este episódio foi contido pelo programa local de controle do vetor, que foi importante para a extinção da doença nos próximos 4 anos. Entretanto, com a dificuldade de implantar campanhas efetivas de combate ao mosquito houve a dispersão do vírus para outras cidades (Figueiredo, 2000; Nogueira e cols., 2007).

A primeira grande epidemia aconteceu com a entrada do DENV-1, em 1986, no estado do Rio de Janeiro e a situação se agravou consideravelmente com a introdução do DENV-2 em Niterói (RJ) no ano de 1990, onde foi registrado o primeiro caso fatal da doença (Nogueira e cols., 1991; Nogueira e cols., 2007).

Desde então, a dengue, acompanhando a expansão do *A. aegypti*, implantou-se em praticamente todo o país, que contava, ainda, com o risco de entrada dos outros dois sorotipos presentes em países vizinhos, como Colômbia, Venezuela, México e Caribe (Schatzmayr, 2001). Por conseguinte, em dezembro de 2000, o DENV-3 foi isolado primeiramente no município de Nova Iguaçu (RJ), sendo responsável pela alarmante epidemia no verão de 2001-2002, marcada pelo maior número de casos e mortes confirmados até aquele momento, bem como por manifestações clínicas mais graves. Somente no estado do Rio de Janeiro, em 2002, foram documentados 288.245 casos de dengue, 1.831 casos de formas graves da doença e 91 óbitos. Essas notificações excederam os 1.621 casos de formas graves da dengue e 76 óbitos registrados em todo o país desde a reintrodução do DENV em 1986 (Nogueira e cols., 2001; Nogueira e cols., 2005).

O DENV-3 predominou na grande maioria dos estados brasileiros entre 2002 e 2006. No período entre 2007 e 2009, houve a substituição para o DENV-2, contribuindo fortemente para a ocorrência de epidemias em diversos estados. Ao longo de 2009, porém, ocorreu uma nova mudança no sorotipo preponderante, com a recirculação importante do DENV-1 em alguns estados (Informe Epidemiológico da Dengue, MS/SVS, 2010).

Segundo dados da OPAS, no período entre 2002 e 2009 foram notificados no país, mais de 3,5 milhões de casos da doença. Até julho de 2010, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) registrou 482.284 casos confirmados de dengue, 2.271 casos de formas graves da doença e 367 óbitos. Além disso, foi constatado que 20 dos 27 estados apresentaram um aumento no número de casos quando comparado ao mesmo período de 2009. Acredita-se que a recirculação do DENV-1 pode ser um dos fatores envolvidos neste aumento observado em 2010, em virtude da baixa circulação deste sorotipo ao longo da década (Informe Epidemiológico da Dengue, MS/SVS, 2010). Como consequência, o Brasil se tornou, no século XXI, o país com a maior quantidade de casos notificados de dengue e, por este motivo, ocupa o primeiro lugar no ranking internacional de casos total da doença (Teixeira e cols., 2009).

É importante ressaltar que o DENV-4 já foi isolado recentemente em Roraima, totalizando 10 casos confirmados até agosto de 2010. Teixeira e colaboradores já haviam declarado em 2005 que a introdução deste sorotipo era possível devido ao intenso transporte marítimo e aéreo entre o Brasil e outros países afetados. O DENV-4 não circulava no Brasil há 28 anos e fica difícil prever se o mesmo apresentará força de transmissão no território nacional. Como prevenção, o MS adotou algumas medidas como programas de educação em saúde e combate ao vetor, bem como vigilância epidemiológica (Teixeira Mda e cols., 2005; Nota técnica, MS/SVS, 2010).

1.1.6. Manifestações clínicas

Após o período de incubação, a infecção por qualquer um dos quatro sorotipos pode resultar em formas assintomáticas ou subclínicas, além de um amplo espectro de gravidade da doença. As manifestações clínicas da dengue se apresentam como quadros de febre indiferenciada, que caracterizam a Febre da Dengue (FD), ou quadros graves que podem evoluir ao óbito, conhecidos como Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome de Choque da Dengue (SCD) (TDR e WHO, 2009).

A FD manifesta-se como uma doença febril aguda e autolimitada que ocorre do segundo ao sétimo dia após a infecção. É marcada por febre $\geq 39^{\circ}\text{C}$ de início abrupto, cefaléia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, náuseas e vômitos. Estes sintomas podem ser acompanhados por leucopenia e trombocitopenia, bem como manifestações hemorrágicas. Por volta de uma semana após o estabelecimento da doença, os pacientes normalmente se recuperam sem complicações e, em vista disto, a FD raramente está associada à morte. Contudo, durante o curso de infecção pelo DENV, alguns pacientes podem progredir para as formas mais graves da doença (Kurane, 2007; Noisakran e Perng, 2008).

As manifestações clínicas iniciais da FHD são similares as da FD. Todavia, o que determina a gravidade e a diferencia da forma não grave é o extravasamento de plasma, que ocorre devido ao aumento na permeabilidade vascular, sendo acusado por hematócrito elevado. Além disto, trombocitopenia ($\leq 100.000/\text{mm}^3$), leucopenia, manifestações hemorrágicas, distúrbios na coagulação e danos hepáticos também são observados (WHO, 1997; Solomon e Mallewa, 2001; Noisakran e Perng, 2008).

A FHD pode evoluir para a SCD, que é caracterizada por falência circulatória, incluindo diminuição da pressão de pulso, hipotensão e choque hipovolêmico. Este último está associado ao extravasamento plasmático e o seu prolongamento promove o desenvolvimento de acidose metabólica, sangramento no trato gastrointestinal e em outros órgãos. O choque tem curta duração, podendo levar ao óbito entre 12 e 24 horas caso não haja reposição volêmica (WHO 1997; Rigau-Perez e cols., 1998).

1.1.7. Imunopatogênese

No início do século XX, a busca por modelos animais capazes de reproduzir os sinais clínicos da dengue tornou-se intensa, visto que estudos em humanos são considerados complicados em virtude das rápidas mudanças no quadro clínico, da dificuldade na obtenção de espécimes provenientes de pacientes com hemostase prejudicada, além de outros fatores. Dentro deste contexto, inúmeros modelos murinos foram desenvolvidos, embora nenhum deles seja capaz de representar o amplo espectro da doença (Atrasheuskaya e cols., 2003;

Bente e Rico-Hesse, 2006). Estes modelos incluem tanto a infecção de camundongos selvagens com o DENV isolado de paciente (Paes e cols., 2005; Paes e cols., 2009), quanto de camundongos selvagens, transplantados com células humanas ou imunocomprometidos com cepas de vírus adaptadas à via intracerebral (Atrasheuskaya e cols., 2003; Bente e Rico-Hesse, 2006; Yauch e Shresta, 2008; Souza e cols., 2009). Apesar das limitações, os modelos murinos representam importantes avanços para as pesquisas em patogênese da dengue, já que os camundongos reproduzem alguns dos sinais clínicos observados em humanos, tais como: viremia, febre, trombocitopenia, hemoconcentração, aumento na permeabilidade vascular, injúria hepática, níveis elevados de citocinas e quimiocinas, hemorragia tecidual, hipotensão e/ou morte.

As hipóteses propostas para a compreensão da patogenia da FHD/SCD foram baseadas, principalmente, em observações experimentais *in vitro* e, mais recentemente, graças ao desenvolvimento de um modelo animal que apresenta as características clínicas da forma grave da doença, em modelos experimentais *in vivo*. Acredita-se que diversos fatores possam influenciar a gravidade da doença, incluindo fatores relacionados ao hospedeiro e ao vírus (Atrasheuskaya e cols., 2003; Green e Rothman, 2006; Souza e cols., 2009). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na progressão da doença para as formas mais graves ainda não foram completamente esclarecidos (Kyle e Harris, 2008).

1.1.7.1. Fatores virais

Com o advento das técnicas que permitiram o sequenciamento do genoma, os quatro sorotipos do DENV foram classificados em distintos grupos genéticos ou genótipos. Há evidências de que a variabilidade genética entre as cepas virais pode estar associada a diferenças na virulência (Cologna e Rico-Hesse, 2003; Rico-Hesse, 2009). De fato, comparações entre genótipos virais e dados epidemiológicos permitiram a associação das elevadas taxas de transmissão e da incidência de FHD com grupos virais específicos (Rico-Hesse e cols., 1997; Messer e cols., 2003).

Leitmeyer e cols. demonstraram as desigualdades entre o DENV-2 genótipo sudeste asiático, que tem sido associado com FD e FHD, e o DENV-2 genótipo americano, comumente relacionado com FD. Foi observado que as diferenças nas sequências da glicoproteína E e das regiões não codificantes 5' e 3' do genoma podem estar relacionadas com as alterações na virulência entre os diferentes genótipos (Leitmeyer e cols., 1999; Pryor e cols., 2001).

Além da virulência, outros fatores como viremia e presença de proteínas virais no sangue podem estar relacionados com a gravidade da doença (Clyde e cols., 2006). No entanto, os

estudos são controversos. Foi demonstrado, durante um surto em Taiwan no ano de 1998, uma correlação positiva entre a viremia e o desenvolvimento de FHD pelo DENV-3 (Wang e cols., 2003). Em paralelo aos altos títulos virais, a forma secretada da proteína NS1 estava presente em maior quantidade no plasma de pacientes com FHD em comparação aos com FD (Libraty e cols., 2002). Por outro lado, foi observado, durante surtos em Taiwan nos anos de 2002 e 2003 pelo DENV-2, que a viremia de pacientes com FD ou FHD não era significativamente diferente (Chen e cols., 2005).

1.1.7.2. Fatores do hospedeiro

Dados epidemiológicos indicam que cerca de 90% dos casos de FHD ocorrem em infecções secundárias heterólogas (Mathew e Rothman, 2008). A fim de explicar essas observações, a teoria da amplificação dependente de anticorpos (ADE – *antibody dependent enhancement*) foi proposta (Halstead e O'Rourke, 1977; Halstead, 1988). De acordo com esta teoria, anticorpos específicos contra o sorotipo do DENV, provenientes da infecção primária, seriam capazes de reconhecer o sorotipo heterólogo, porém incapazes de neutralizá-lo. A opsonização do vírus infectante por anticorpos IgG não neutralizantes levaria à formação de complexo imune capaz de ligar-se a receptores que reconhecem a porção Fc das moléculas de anticorpo IgG (FcγR), presentes na superfície de células alvo, tais como monócitos e macrófagos. Isso facilitaria a entrada do DENV nestas células, culminando no aumento da replicação viral e conseqüentemente maior título viral, produção de citocinas e ativação de células do sistema imunológico; contribuindo para o desenvolvimento das formas graves da doença (Kliks e cols., 1989; McBride e Bielefeldt-Ohmann, 2000; Vaughn e cols., 2000; Green e Rothman, 2006).

A hipótese da ADE tem sido demonstrada principalmente através de observações epidemiológicas e estudos *in vitro* (McBride e Bielefeldt-Ohmann, 2000). Embora esta hipótese seja um dos mecanismos mais aceitos e difundidos para explicar a evolução para a FHD/SCD, a relevância deste fenômeno *in vivo* ainda não foi completamente esclarecida (Mathew e Rothman, 2008). Dados recentes mostraram um aumento significativo nos títulos virais em primatas não humanos que receberam anticorpos anti-DENV e, em seguida, infectados com sorotipo heterólogo, sugerindo que este fenômeno possa ocorrer *in vivo* (Goncalvez e cols., 2007).

Desde 1945, Cuba não registrava casos de dengue, entretanto em 1977-1978 houve uma epidemia causada pelo DENV-1. A população cubana, então, ficou sob risco de infecção secundária caso um diferente sorotipo fosse introduzido no país. Isto aconteceu em 1981, com a introdução do DENV-2. Nesta nova epidemia, quadros mais graves foram notificados e

testes realizados em pacientes que desenvolveram FHD/SCD mostraram, em 98% dos casos examinados, um padrão sorológico consistente com infecção secundária. Adicionalmente, crianças menores de dois anos, nascidas depois da primeira epidemia, não desenvolveram as formas graves da doença. Entretanto, crianças menores de um ano evoluíram ao óbito e acredita-se que estas eram nascidas de mães imunes ao DENV-1 (Kouri e cols., 1989).

Em outro estudo, foi constatado que a infecção de células THP-1 na presença de anticorpos não neutralizantes promoveu aumento tanto da replicação viral quanto da expressão de citocinas anti-inflamatórias, como interleucinas (IL) -6 e -10. Por outro lado, a produção de IL-12, interferon (IFN) γ e óxido nítrico foi suprimida. Sendo assim, a ADE facilita não apenas o processo de internalização viral, mas modifica os mecanismos antivirais de resposta intracelular, resultando no aumento da replicação do DENV e contribuindo para a patogênese da doença (Chareonsirisuthigul e cols., 2007).

As pesquisas têm focado quase que exclusivamente em infecções secundárias e, portanto, têm ignorado os casos de infecções primárias que evoluem para as formas mais graves e até mesmo ao óbito (Halstead e cols., 2002). Aproximadamente 10% dos casos de FHD/SCD ocorrem em pacientes durante a primeira infecção, dos quais a maioria são crianças entre 6 e 12 meses de vida (Green e Rothman, 2006). Acredita-se que anticorpos maternos IgG anti-DENV sejam transferidos através da placenta, contribuindo para o fenômeno da ADE que também parece estar associado ao desenvolvimento de FHD em crianças menores de 1 ano de idade (Simmons e cols., 2007). Durante os primeiros meses de vida, estes anticorpos protegem as crianças da infecção pelo DENV. Porém, aos 6 meses de idade, os títulos de anticorpos anti-DENV decaem para níveis subneutralizantes e aos 12 meses de vida desaparecem do soro, reduzindo, portanto, o risco de desenvolvimento das formas graves (Halstead e cols., 2002; Watanaveeradej e cols., 2003; Pengsaa e cols., 2006).

Outra teoria que explica a maior gravidade da dengue observada na infecção secundária é a do “pecado antigênico original” (Mongkolsapaya e cols., 2003). Durante a infecção secundária, ocorre um aumento da apresentação de antígenos bem como da ativação de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ de memória da infecção prévia por outro sorotipo. A proliferação dessas células T de memória, mas de baixa especificidade para o outro sorotipo, se sobressai em relação à expansão das células T “naive” (não ativadas previamente) de maior avidéz para o sorotipo infectante, promovendo uma alteração na resposta imunopatológica (Pang e cols., 2007; Mathew e Rothman, 2008). Neste cenário, há também um aumento na secreção de citocinas proinflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , que podem agir diretamente sobre as células do endotélio vascular, resultando em aumento da permeabilidade e extravasamento do plasma (Mangada e cols., 2002).

Entretanto, durante a infecção primária pelo DENV também foi observado que a concentração de determinados mediadores inflamatórios encontrava-se aumentada (Iyngkaran e cols., 1995). Sendo assim, acredita-se que um dos fatores responsáveis pela evolução da doença para as formas mais graves é a ativação, principalmente, de células T, monócitos/macrófagos, células dendríticas, hepatócitos e células endoteliais, que culmina na liberação exacerbada de citocinas (Pang e cols., 2007). Portanto, é de se esperar que pacientes com FD apresentem níveis ou perfis de mediadores inflamatórios diferentes daqueles observados em pacientes com FHD (Pacsa e cols., 2000). De fato, a análise do soro de pacientes infectados indicou que a concentração de IL-12 (Pacsa e cols., 2000) e da proteína inflamatória de macrófagos (MIP) -1 β (Bozza e cols., 2008) encontrava-se elevada durante a FD quando comparada com a FHD. Em contrapartida, os níveis de IL-4 (Bozza e cols., 2008), IL-8 (Raghupathy e cols., 1998), IL-10 (Green e cols., 1999), IL-13 (Mustafa e cols., 2001; Bozza e cols., 2008), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (Bozza e cols., 2008) e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) (Chen e cols., 2006) estavam elevados durante a FHD quando comparados com a FD.

A análise do secretoma de células HepG2 demonstrou que o MIF era produzido durante a infecção *in vitro* pelo DENV-2 (Higa e cols., 2008). O MIF é um mediador proinflamatório expresso por distintos tipos celulares, não apenas do sistema imunológico, e liberado em resposta a diversos estímulos. Os efeitos mediados pelo MIF, em parte através do receptor CD74-CD44, CXCR2 e CXCR4, incluem a indução da produção de mediadores inflamatórios, a expressão de receptores do tipo *Toll* (TLR) e moléculas de adesão, a neutralização dos efeitos dos glicocorticóides, o potencial quimioatrativo e o aumento da sobrevivência de leucócitos (Calandra e Roger, 2003; Leng e cols., 2003; Shi e cols., 2006; Bernhagen e cols., 2007). Como observado em pacientes com sepse (Bozza e cols., 2004), a concentração desta citocina estava relacionada à gravidade da dengue (Chen e cols., 2006), porém o papel do MIF na patogênese da doença ainda precisa ser investigado.

Algumas das manifestações clínicas observadas durante as formas graves da dengue se assemelham às mudanças patofisiológicas observadas em animais após a ativação sistêmica do receptor do fator de ativação plaquetária (PAF) (Ishii e Shimizu, 2000; Stafforini e cols., 2003). Macrófagos obtidos de pacientes infectados pelo DENV-1 liberam quantidades significativas de PAF quando comparados com o controle (Yang e cols., 1995). Em modelo animal de infecção *in vivo*, foi observado que a ativação do receptor do PAF (PAFR) estava envolvida no aumento da permeabilidade vascular, trombocitopenia, níveis elevados de citocinas, choque e hemorragia. Os resultados demonstram que este receptor desempenha funções durante a infecção experimental pelo DENV e o seu bloqueio previne manifestações

graves da doença e o aumento do título viral sistêmico, sugerindo um papel importante do PAF durante a evolução da doença para as formas mais graves (Souza e cols., 2009).

Além disso, foi demonstrado que alguns marcadores imunológicos podem estar diretamente relacionados com sintomas específicos da doença. Há correlação entre a concentração de GM-CSF com hipotensão; por outro lado, MIP-1 β mostrou-se associado com bom prognóstico e acredita-se que este efeito seja devido ao seu potencial quimioatrativo e ativador de células NK, que são eficientes no controle de vírus (Bozza e cols., 2008). No entanto, os fatores determinantes da produção diferencial dos diversos mediadores, bem como os papéis de cada uma destas moléculas no complexo cenário fisiopatológico da dengue necessitam esclarecimento.

Através da análise da expressão de genes envolvidos na resposta imune inata, Gomes e colaboradores associaram alguns destes genes com a gravidade da dengue. Neste estudo foi observado que os níveis de expressão de TLR7 e MYD88 estavam significativamente elevados em pacientes com FHD quando comparados com pacientes com FD, sugerindo que o padrão de expressão de determinados genes possa ser importante na distinção entre os pacientes com a forma grave da doença daqueles com a forma clássica (Gomes e cols., 2010).

A relação entre a gravidade da dengue e a ativação exacerbada do sistema imunológico fez alguns pesquisadores sugerirem que a resposta imune aos componentes do DENV pudesse contribuir para uma reação autoimune, que, por fim, levaria ao desenvolvimento da FHD/SCD (Halstead, 2007). Foi demonstrada uma reatividade cruzada de anticorpos anti-NS1 com células endoteliais, culminando na ativação das mesmas. Esta ativação era acompanhada pela produção de IL-6, IL-8 e da proteína quimiotática de monócitos do tipo 1 (MCP-1), bem como pelo aumento na expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM) -1 e na capacidade de aderência às células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (Lin e cols., 2005). Desta forma, a hipótese da autoimunidade ou do mimetismo molecular propõe que a disfunção endotelial, observada durante os casos graves, seja resultante da reatividade cruzada entre anticorpos anti-NS1 e proteínas do hospedeiro e/ou células endoteliais (Halstead, 2007).

Outros fatores, incluindo a ativação do complemento, também foram propostos na patogenia da dengue. Avirutnan e colaboradores demonstraram que a proteína NS1 era capaz de ativar esta via (Avirutnan e cols., 2006). Adicionalmente, foi observado através de estudos clínicos que os níveis tanto desta proteína quanto dos produtos provenientes da ativação da cascata do complemento estavam presentes em grande quantidade, antes da ocorrência do extravasamento plasmático, em pacientes infectados (Nishioka, 1974; Avirutnan e cols., 2006; Wang e cols., 2006). Recentemente, foi demonstrado que pacientes com FHD apresentavam níveis elevados de C3a, C4a, C5a e fator D quando comparados com pacientes com FD. Por

outro lado, os níveis de C3 e fator H encontravam-se reduzidos em pacientes com a forma grave da doença quando comparados com pacientes com a forma clássica (Nascimento e cols., 2009). Sendo assim, as evidências sugerem que a ativação exacerbada da via do complemento esteja envolvida no desenvolvimento das formas graves da doença e que o desequilíbrio nos níveis dos fatores D e H esteja associado à regulação anormal desta via em pacientes com FHD.

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento das formas graves foram sugeridos, incluindo asma brônquica, anemia falciforme e diabetes (Guzman e Kouri, 2008). Em Cuba, alguns casos graves e até mesmo fatais mostraram-se significativamente associados a essas doenças crônicas (Guzman, 2005). Um estudo demonstrou que a idade dos pacientes também pode ser considerada um fator de risco, uma vez que a mortalidade em crianças de 3 a 14 anos de idade, com infecções secundárias, foi 14,5 vezes maior quando comparada em adultos de 15 a 39 anos (Guzman e cols., 2002).

Quanto à contribuição genética para a patogênese da dengue, foi observado que caucasianos apresentam uma maior predisposição para o desenvolvimento de FHD em relação aos negróides e, portanto, diversos genes humanos que regulam a gravidade da doença podem estar distribuídos de forma desigual entre as raças (de la e cols., 2007). Estudos sugerem que polimorfismos nos genes ligados ao complexo do antígeno leucocitário humano (HLA) e não HLA podem estar associados ao aumento na susceptibilidade à FHD (Chaturvedi e cols., 2006). Na população cubana, HLA I (-A, -B e -C) foi relacionado com aumento na susceptibilidade à doença grave, enquanto HLA II (DRB1) foi associado com resistência à doença (Sierra e cols., 2007). Além disso, foi observado na população brasileira que polimorfismos no gene MBL2 protegem contra o desenvolvimento de trombocitopenia associado ao fenótipo grave da doença (Acioli-Santos e cols., 2008). Essas evidências revelam a importância da genética do hospedeiro na modulação da doença.

As hipóteses citadas para tentar explicar a patogênese da FHD/SCD nos mostram o quão complexo é a interação do DENV com as células hospedeiras. Acredita-se que a combinação de fatores de riscos individuais, genéticos, epidemiológicos e virais contribua para o aparecimento das formas graves da doença (Kouri e cols., 1989).

1.1.8. Prevenção e controle

As estratégias para a prevenção e o controle da dengue tornaram-se mais urgentes com a expansão geográfica do vírus e do vetor, bem como pelo aumento na incidência de casos graves nos últimos anos. A principal estratégia de controle da transmissão da dengue é a redução da população do seu principal vetor, o mosquito *A. aegypti*. Contudo, o controle deste

mosquito é considerado extremamente difícil devido a sua íntima relação com os humanos (Gubler, 1998a; Gibbons e Vaughn, 2002).

As ferramentas disponíveis para prevenir a doença são bastante limitadas (Gubler, 1998a). Enquanto vacinas contra outros flavivírus, incluindo os vírus da febre amarela e da encefalite japonesa, já foram desenvolvidas, as vacinas contra os DENV ainda estão sobre intensa investigação (Gould e Solomon, 2008). Evidências sugerem que as vacinas capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos serão eficazes na prevenção da doença e não contribuirão para o desenvolvimento da ADE (Whitehead e cols., 2007). Sendo assim, este requerimento em associação com o desenvolvimento de uma imunidade duradoura constituem os maiores desafios para a produção de vacinas contra a dengue.

As dificuldades de prevenção e controle encontradas ressaltam a importância do desenvolvimento de agentes terapêuticos específicos contra a doença. Propõe-se que fatores virais e do hospedeiro considerados essenciais para o ciclo de replicação do DENV possam atuar como potenciais alvos terapêuticos (Noble e cols., 2010).

Avanços recentes têm demonstrado, através da remoção química de colesterol das membranas celulares, que este lipídio estava envolvido na entrada e replicação do DENV (Lee e cols., 2008). Outro estudo constatou que a enzima mevalonato difosfato descarboxilase (MVD), essencial para a biossíntese de colesterol, era requerida para a replicação viral (Rothwell e cols., 2009), sugerindo que drogas utilizadas na inibição da biossíntese de colesterol poderiam ser testadas contra a dengue.

O acúmulo intracelular de lipídios em corpúsculos lipídicos está associado a doenças de grande relevância para a saúde pública, incluindo doenças inflamatórias e infecciosas (Bozza e cols., 2009). Durante a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), um membro pertencente à família do DENV, foi observado que essas organelas citoplasmáticas aumentavam em número e estavam envolvidas na replicação e produção de partículas virais infecciosas (Miyazaki e cols., 2007; Targett-Adams e cols., 2008a; Targett-Adams e cols., 2008b). Esses dados indicam que os corpúsculos lipídicos possam ser alvo potencial para a terapia contra a hepatite C. De fato, o conjunto de resultados destaca a importância do metabolismo lipídico no ciclo de replicação dos membros da família *Flaviviridae*. Entretanto, o estudo da função dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo DENV ainda não foi avaliado.

1.2 Corpúsculos lipídicos

1.2.1 Características gerais, composição e funções

Os corpúsculos lipídicos, também chamados de gotas lipídicas ou adipossomos, são organelas citoplasmáticas ricas em lipídios presentes em virtualmente todos os organismos (Bozza e cols., 2009). Em algumas células de mamíferos, como hepatócitos e adipócitos, os corpúsculos lipídicos estão abundantemente presentes, enquanto que em outros tipos celulares, incluindo leucócitos, o acúmulo citoplasmático destas estruturas se dá através de um processo induzido por uma variedade de estímulos (Murphy, 2001).

O tamanho, a regulação, a composição e, conseqüentemente, a função destas organelas podem variar consideravelmente entre tipos celulares. Os corpúsculos lipídicos são inclusões citoplasmáticas esféricas, não delimitados por uma membrana clássica, associados a elementos do citoesqueleto e que em estudos ultraestruturais apresentam elétrons-densidade variável (Murphy, 2001; Bozza e cols., 2007). Estes domínios são constituídos basicamente por lipídios neutros, como triacilglicerol, diacilglicerol, colesterol livre e ésteres de colesterol; associados a uma variada composição protéica e envolvidos por uma monocamada de fosfolipídios (Zweytick e cols., 2000; Brown, 2001; Murphy, 2001). A análise da composição da monocamada que envolve os corpúsculos lipídicos revelou que esta é composta por fosfatidilcolina e ácidos graxos insaturados (Tauchi-Sato e cols., 2002), diferindo dos fosfolipídios encontrados nas membranas do RE e de microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídios.

Por muito tempo, estas organelas foram representadas como depósitos inertes de gordura e sítios de transporte de lipídios. Atualmente, dados indicam que os corpúsculos lipídicos são estruturas altamente dinâmicas e funcionalmente ativas. Em leucócitos, estas estruturas aumentam em número e tamanho durante processos inflamatórios e infecciosos, além de desempenhar funções como organelas especializadas, incluindo envolvimento na sinalização e ativação celular, na regulação do metabolismo e tráfego lipídico, bem como no controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (Bozza e cols., 2009). Com coloração e fixação apropriadas, os corpúsculos lipídicos podem ser visualizados (figura 1.6 B-D), enquanto que colorações rotineiras constituídas por alcoóis provocam a dissolução destas estruturas (figura 1.6A) (Pacheco e cols., 2002).

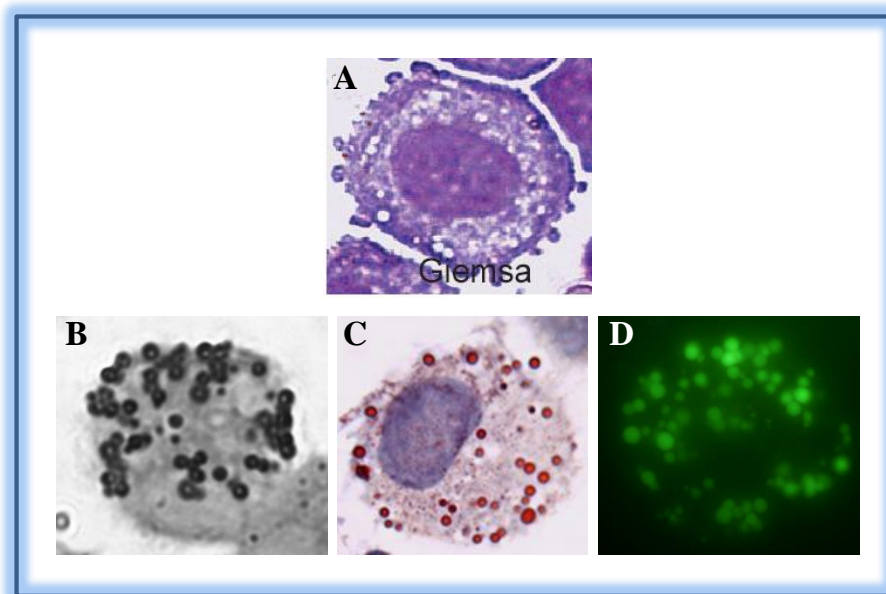


Figura 1.6. Corpúsculos lipídicos em macrófagos ativados. Os corpúsculos lipídicos foram visualizados por microscopia de luz (A-C) ou fluorescência (D) após coloração com May-Grunwald-Giemsa (A), ósmio (B), oil red O (C) e BODIPY™ 493/503 (D) (adaptada de Bozza e cols., 2007; D'Avila e cols., 2008).

Os corpúsculos lipídicos apresentam um conteúdo protéico diversificado, caracterizado principalmente por proteínas da família PAT. As principais proteínas PAT descritas relacionadas com os corpúsculos lipídicos, consideradas essenciais para o estoque e metabolismo de lipídios, compreendem a perilipina, a adipofilina ou proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos (ADRP) e a proteína de interação de porção terminal de 47 kDa (TIP47) (Londos e cols., 2005). Estas proteínas parecem estar diretamente envolvidas na organização estrutural e biogênese destas organelas (Londos e cols., 1999; Miura e cols., 2002; Wolins e cols., 2006; Robenek e cols., 2009). Em particular, a ADRP tem sido associada a corpúsculos lipídicos de diferentes tipos celulares e descrita como uma proteína específica, sendo considerada, portanto, um importante marcador para estas inclusões dinâmicas (Brasaemle e cols., 1997; Heid e cols., 1998).

Importantes enzimas envolvidas no metabolismo de colesterol, como esqualeno epoxidase e lanosterol sintase, e na síntese de ácidos graxos, incluindo acetil-CoA carboxilase e ACSL3, também foram encontradas em corpúsculos lipídicos de diferentes tipos celulares, sugerindo que processos anabólicos e catabólicos possam ocorrer nestas organelas (Fujimoto e cols., 2004; Liu e cols., 2004; Umlauf e cols., 2004; Wan e cols., 2007). Além destas enzimas, quinases conhecidas por regular sinais extracelulares, tais como proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), quinase regulada por sinal extracelular (ERK), p38, proteína quinase C (PKC) e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), encontraram-se localizadas nestes

domínios citoplasmáticos de leucócitos que, portanto, podem estar envolvidos na sinalização intracelular (Yu e cols., 1998; Yu e cols., 2000; Chen e cols., 2002).

Outros grupos de proteínas presentes em corpúsculos lipídicos foram descritos. Citocinas como o TNF- α (Beil e cols., 1995; Pacheco e cols., 2002), quimiocinas como a regulada sob ativação, normalmente expressa e secretada por células T (RANTES) e a IL-16 (Lim e cols., 1996), bem como fatores de crescimento (Dvorak e cols., 2001) foram detectados nestas organelas de leucócitos ativados. Entretanto, ainda não foi elucidado como estes mediadores são liberados dos corpúsculos lipídicos e/ou se eles possuem capacidade de sinalização nestas estruturas.

Nos últimos anos, foi proposto que o aumento do número de corpúsculos lipídicos em leucócitos poderia resultar num aumento da produção de eicosanóides por estas células (Bozza e cols., 2007). Isto porque inicialmente foi demonstrado que os corpúsculos lipídicos de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos atuam como sítios intracelulares de araquidonato esterificado tanto em lipídios neutros quanto em diferentes classes de fosfolipídios (Weller e cols., 1989; Weller e cols., 1991; Yu e cols., 1998; Johnson e cols., 1999). Em seguida, foi descrita a presença de enzimas envolvidas na liberação do ácido araquidônico (AA), incluindo fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) e MAPK, em corpúsculos lipídicos (Yu e cols., 1998; Wooten e cols., 2008; Moreira e cols., 2009). Sendo assim, o araquidonato livre, poderia, então, ter acesso a enzimas formadoras de eicosanóides, como a 5-lipoxigenase (5-LO) e ciclooxigenase (COX), que se encontraram colocalizadas nestes domínios citoplasmáticos (Bozza e cols., 1997; Bozza e cols., 1998; Pacheco e cols., 2002). Em vista disso, estudos relataram uma correlação positiva entre a formação de corpúsculos lipídicos e o aumento da produção de eicosanóides derivados das enzimas LO e COX, como leucotrieno (LT) B₄ e prostaglandina (PG) E₂ (Bozza e cols., 1996a; Bozza e cols., 1996b; Bozza e cols., 1997; Pacheco e cols., 2002).

Uma vez que os eicosanóides não são estocados e, desta forma, rapidamente liberados após estímulo celular, o acesso direto ao local de produção intracelular era inacessível. Entretanto, através da técnica *EicosaCell* (Bandeira-Melo e cols., 2001b, 2011), que permite a fixação destes mediadores nos seus locais de síntese, nosso grupo demonstrou que os corpúsculos lipídicos de leucócitos ativados atuam como locais de síntese de LTC₄, LTB₄ e PGE₂ (Bandeira-Melo e cols., 2001b; Bandeira-Melo e cols., 2002a; Vieira-de-Abreu e cols., 2005; D'Avila e cols., 2006; Pacheco e cols., 2007). O papel dos eicosanóides derivados destas estruturas pode variar dependendo do tipo celular, estímulo e condição inflamatória (Bozza e cols., 2007).

1.2.2 Biogênese

Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar o processo de formação dos corpúsculos lipídicos. Em eucariotos, a mais aceita propõe que os lipídios neutros são sintetizados por enzimas do RE e depositados, até uma determinada concentração, entre as duas folhas da membrana do RE. A seguir, são liberados no citoplasma carregando uma hemimembrana proveniente da face citosólica da membrana do RE. Esta observação é compatível com a organização dos corpúsculos lipídicos (Brown, 2001; Murphy, 2001; Tauchi-Sato e cols., 2002).

A gênese destas estruturas não é uma manifestação de injúria celular ou simplesmente atribuída ao acúmulo de ácidos graxos, mas sim um fenômeno altamente regulado que depende do estímulo e tipo celular, além de uma variedade de condições patológicas (Bozza e Bandeira-Melo, 2005). Assim, agonistas lipídicos e protéicos bem como estímulos infecciosos podem levar à formação de corpúsculos lipídicos em diferentes tipos celulares (Bozza e cols., 2009).

Trabalhos de Bozza e colaboradores mostraram a participação do AA e ácido oléico (AO) na biogênese dos corpúsculos lipídicos, onde a aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroidais foram capazes de inibir a formação destas organelas induzida por estes lipídios. Contudo, o salicilato de sódio, que não inibe a enzima COX, apresentou a mesma propriedade de inibição que a aspirina, sugerindo que este fenômeno é independente da ativação de COX. Nas análises das isoformas de COX durante a formação dos corpúsculos lipídicos, foram utilizados camundongos deficientes de COX-1 e COX-2 e os resultados obtidos mostraram que a indução destas organelas por AA ou AO não foi diferente daquela observada em animais selvagens. Estes resultados propõem que a formação de corpúsculos lipídicos é independente da ativação tanto de COX-1 quanto de COX-2 (Bozza e cols., 1996b; Bozza e cols., 2002).

Vários estudos demonstraram que citocinas e quimiocinas ativam vias de sinalização intracelular levando à formação de corpúsculos lipídicos (Bozza e cols., 1998; Bandeira-Melo e cols., 2001a; Bandeira-Melo e cols., 2001b; Bandeira-Melo e cols., 2002b). Dentro deste contexto, observamos que a quimiocina MCP-1 estava envolvida na regulação da gênese de corpúsculos lipídicos, em macrófagos, durante inflamação induzida por LPS ou sepse experimental. Este evento mostrou ser dependente do receptor CCR2, da sinalização envolvendo MAPK e PI3K, bem como da dinâmica microtubular (Pacheco e cols., 2007).

A relação entre a formação de corpúsculos lipídicos e infecções por parasitas intracelulares tanto em modelos de infecções clínicas quanto experimentais tem sido documentada. Os corpúsculos lipídicos parecem estar correlacionados com mecanismos de

patogênese, sobrevivência e multiplicação do microorganismo invasor. Entretanto, os mecanismos que desencadeiam o fenômeno de formação de corpúsculos lipídicos induzidos por patógenos intracelulares não são completamente entendidos (Bozza e cols., 2007; D'Avila e cols., 2008).

1.2.3 Envolvimento dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo vírus da hepatite C

Nos últimos anos, tem sido proposto que o impacto da infecção crônica pelo HCV sobre o metabolismo lipídico seja importante tanto na progressão da doença hepática quanto na resposta ao tratamento antiviral (Negro, 2004; McLauchlan, 2009b). A esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo hepatocelular de corpúsculos lipídicos, é o fenótipo histológico proeminente durante a infecção pelo HCV, acometendo 73% dos pacientes infectados pelo genótipo 3 e 50% daqueles infectados por outros genótipos (Negro e Sanyal, 2009; Syed e cols., 2009).

Além de atuar como marcador patológico, os corpúsculos lipídicos são frequentemente citados como organelas alvo para proteínas do HCV. A contribuição destas inclusões citoplasmáticas durante a infecção não está completamente esclarecida devido à dificuldade de cultivo viral em condições laboratoriais, bem como à falta de um modelo animal apropriado. No entanto, a associação de duas proteínas do HCV, C e NS5A, aos corpúsculos lipídicos já é conhecida há mais de 10 anos (Moradpour e cols., 1996; Barba e cols., 1997; Hope e McLauchlan, 2000; Shi e cols., 2002). A detecção da proteína NS5A – envolvida na replicação e montagem de partículas virais infecciosas – na superfície destas organelas é menos aparente quando comparada com a proteína C – envolvida na formação do nucleocapsídeo, onde é empacotado o genoma viral – já que grande parte fica localizada na membrana do RE (Brass e cols., 2002; McLauchlan, 2009a). Apesar de estudos adicionais serem requeridos para definir de maneira mais precisa a natureza da interação entre a proteína NS5A e os corpúsculos lipídicos, muito já se sabe sobre a associação da proteína C com estas estruturas (McLauchlan, 2009a).

Através da utilização de um sistema capaz de produzir partículas virais infecciosas, foi demonstrado que a habilidade da proteína C em associar-se com a superfície dos corpúsculos lipídicos está relacionada com a produção do HCV, uma vez que mutações no domínio C-terminal hidrofóbico (D2) desta proteína, envolvido na interação com os corpúsculos lipídicos, prejudicavam a produção de partículas virais infecciosas (Boulant e cols., 2007). Similarmente, o impedimento da maturação da proteína C leva tanto ao bloqueio da localização desta proteína nos corpúsculos lipídicos quanto à redução da secreção de partículas virais infecciosas (Targett-Adams e cols., 2008b). No caso da proteína NS5A, foi

observado que mutações no domínio envolvido na associação com estas organelas também previne a produção de progênie infecciosa (Miyanari e cols., 2007).

Além disso, foi demonstrado que a proteína C é capaz de alterar a mobilidade dos corpúsculos lipídicos de uma forma dependente da dinâmica microtubular, com implicações na capacidade infecciosa do HCV. Ela desloca a principal proteína estrutural dos corpúsculos lipídicos, a ADRP, proposta na regulação da interação destas estruturas com os microtúbulos e também na distribuição intracelular dos corpúsculos lipídicos (Boulant e cols., 2008). Para explicar esse rearranjo intracelular, foi sugerido que a proteína C auxilia o deslocamento dos corpúsculos lipídicos para os locais de síntese de RNA viral, uma vez que o genoma do HCV foi detectado em frações celulares contendo estas organelas (Miyanari e cols., 2007).

Avanços recentes constataram que a proximidade entre os corpúsculos lipídicos de células infectadas e o RNA do HCV é dependente da associação destas estruturas com a proteína C (Targett-Adams e cols., 2008a; Targett-Adams e cols., 2008b). McLauchlan propôs que os corpúsculos lipídicos possam atuar como locais de transferência do RNA viral para a proteína C, dando início ao empacotamento do genoma e à formação do nucleocapsídeo, que representa o primeiro passo da produção de partículas virais (McLauchlan, 2009a). Uma vez que C e NS5A formam interações proteína-proteína (Masaki e cols., 2008), estas podem constituir a ponte entre os corpúsculos lipídicos e os locais de replicação do HCV (figura 1.7).

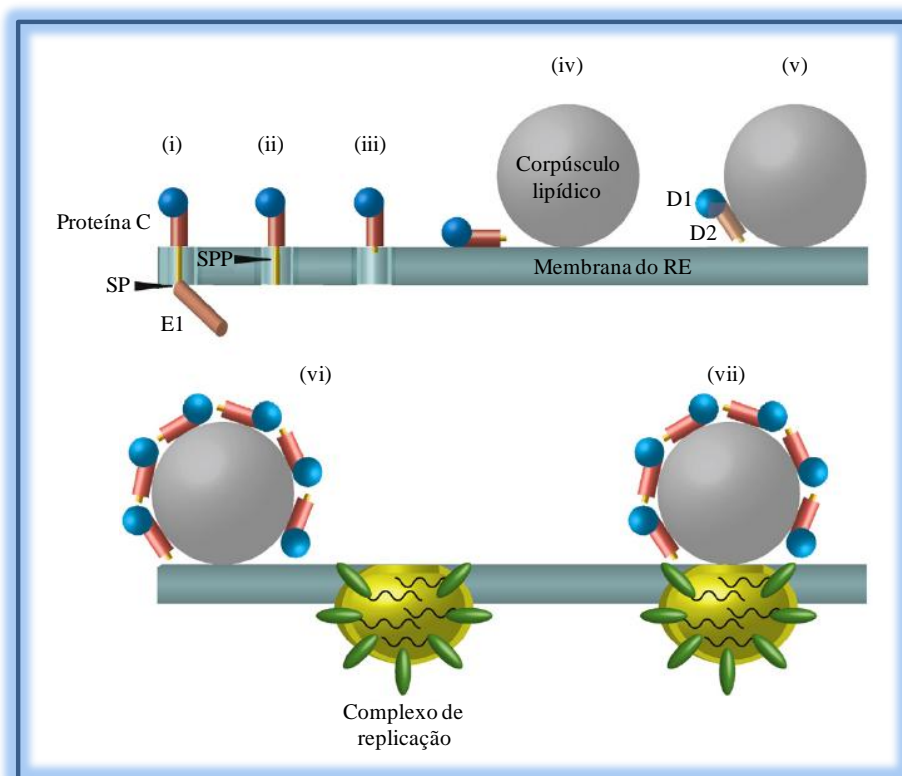


Figura 1.7. Modelo proposto para explicar o papel dos corpúsculos lipídicos na produção do HCV. (i) A poliproteína do HCV é ancorada à membrana do RE. O peptídeo sinal localizado entre a proteína C e a glicoproteína E1 é clivado pela peptidase sinal (SP). Este processamento produz a forma imatura da proteína C (localizada no citoplasma) e a porção N-terminal da glicoproteína E1 (localizada no lúmen do RE). (ii) A forma madura da proteína C é gerada pela clivagem do peptídeo sinal dentro de C-E1 pela peptidase do peptídeo sinal (SPP). (iii e iv) A proteína C madura é liberada da poliproteína e trafega sobre a membrana do RE até a transferência para a superfície do corpúsculo lipídico. (v) A associação entre a proteína C e os corpúsculos lipídicos é mediada pelo domínio D2. (vi) A proteína C continua localizada na superfície dos corpúsculos lipídicos. Concomitantemente, a síntese do genoma do HCV ocorre em estruturas derivadas da membrana do RE, designadas como complexo de replicação (RC). O RC é constituído por proteínas não estruturais associadas (verde) que estão envolvidas na replicação do RNA viral. (vii) Os corpúsculos lipídicos associam-se ao RC para facilitar o início da montagem da partícula viral. Esta relação se dá graças à interação entre as proteínas C (localizada nos corpúsculos lipídicos) e NS5A (localizada no RC) (adaptada de McLauchlan, 2009b).

Essas evidências sugerem fortemente que a associação entre a proteína C e os corpúsculos lipídicos seja essencial tanto à patogênese do HCV quanto ao ciclo de replicação viral. Sendo assim, a via de produção de partículas virais infecciosas, que depende destas organelas dinâmicas, pode ser alvo de estratégias futuras para a prevenção e tratamento da infecção pelo HCV (Fukasawa, 2010).

Apesar do HCV ser um membro pertencente à família do DENV, as possíveis relações entre o DENV e os corpúsculos lipídicos ainda não foram avaliados. Desta forma, o estudo da função dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo DENV é de grande relevância para o entendimento da replicação e/ou empacotamento viral, bem como para o estudo da modulação da síntese de mediadores inflamatórios. Além disso, caso se confirme que os vírus se utilizam destas organelas citoplasmáticas como local para sua replicação e montagem, a inibição da formação e/ou função dos corpúsculos lipídicos poderá representar um potencial alvo terapêutico contra a dengue.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

→ Investigar o papel dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo vírus dengue.

2.2. Objetivos específicos

→ Analisar a formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo vírus dengue, bem como sua possível interação com a proteína do capsídeo viral;

→ Estudar o papel dos corpúsculos lipídicos na regulação da capacidade replicativa e/ou infecciosa do vírus dengue;

→ Avaliar o papel dos corpúsculos lipídicos na geração de mediadores inflamatórios durante a infecção viral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Voluntários*

Pacientes recentemente admitidos ao Hospital de Clínicas de Niterói e com suspeita de dengue grave foram convidados a participar como voluntários deste estudo. A inclusão dos voluntários ocorreu durante uma epidemia causada pelo DENV-3 na região. Os pacientes com formas graves de dengue foram aqueles que apresentaram instabilidade hemodinâmica (hipotensão postural, redução da pressão arterial sistólica na posição supina em 20 mmHg ou pressão arterial sistólica < 90 mmHg), manifestações hemorrágicas (teste de torniquete positivo, petéquias, equimoses, sangramento em mucosas ou hemorragia digestiva), trombocitopenia (contagem de plaquetas < 50.000/mm³) e desidratação/hemoconcentração (hematócrito ≥ 20% ou sinais de extravasamento plasmático, como ascite, derrame pleural ou hipoproteinemia).

A coleta do sangue foi realizada por meio de punção venosa em 8 pacientes infectados pelo DENV-3, confirmado por testes de ELISA IgM anti-DENV e RT-PCR específico para o sorotipo 3, e 7 voluntários sadios. As amostras de sangue foram colocadas em gelo para posterior separação dos leucócitos e coleta do plasma, que foram realizadas através de centrifugação a 800 x g, durante 15 minutos e a 4°C. Para as devidas análises foram feitos citocentrifugados com o plasma rico em leucócitos.

3.2. *Cultura de células*

Monócitos humanos, isolados de voluntários sadios através de gradiente de centrifugação em Histopaque (Sigma-Aldrich) e aderidos em frascos de cultura por 3 horas, foram mantidos em placas de 24 poços com lamínulas, em meio de cultura DMEM (Invitrogen) estéril suplementado com 10% de soro humano autólogo, a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂, durante 1 semana para diferenciação em macrófagos.

Células HepG2, uma linhagem celular derivada de hepatocarcinoma humano, foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC). Estas células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL do meio mínimo essencial (MEM) (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen), a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂.

Células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*), uma linhagem de fibroblastos provenientes de rim de hamster, foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL do meio de cultura α-MEM (Invitrogen) suplementado com 10% de SFB (Invitrogen), a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂.

Células de mosquito *Aedes albopictus*, C6/36, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL do meio de cultura L-15 (Invitrogen) suplementado com triptose fosfato 0,3%, bicarbonato de sódio 0,75 g/L, glutamina 1,4 mM, aminoácidos não essenciais e SFB 10%, a 28°C em estufa do tipo B.O.D. 347 CD.

3.3. Preparo dos estoques virais

Para a produção dos estoques dos vírus DENV-2 (cepa 16681) e DENV-3 (cepa 16562), as células C6/36 foram infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 em meio de cultura sem SFB por 90 minutos. Após este período, o meio de cultura foi trocado, suplementado com SFB 2% e as células foram cultivadas por até 9 dias de infecção. Ao término deste período, o meio de cultura contendo as partículas virais foi coletado e centrifugado a 1.000 x g por 5 minutos para a remoção de *debris* celulares. O sobrenadante foi aliquotado em tubos criogênicos estéreis e armazenados a -80°C.

Como controle desse preparo (controle de secretado), as células C6/36 foram submetidas ao mesmo procedimento citado anteriormente, entretanto não foram infectadas – amostras mock.

3.4. Titulação dos vírus

Células BHK-21 confluentes foram infectadas com diluições crescentes do estoque viral na ausência de SFB. Após o período de adsorção de 90 minutos, o inóculo viral foi retirado. Foi adicionada às células uma solução de carboximetilcelulose 1% em meio de cultura α -MEM suplementado com 5% de SFB. Após 5 dias, as células foram fixadas em formaldeído 10% por 2 h, lavadas abundantemente e coradas com solução de cristal violeta 1% e etanol 20% por 40 minutos. O título foi calculado a partir do número de placas contadas nos poços correspondentes às diluições e expresso em unidade formadora de placa por mL (PFU/mL).

3.5. Inativação viral por aquecimento

O DENV foi inativado através da incubação do estoque viral a 65°C por 30 minutos. Este procedimento foi feito imediatamente antes da infecção das células.

3.6. *Cultura de células e infecção com os vírus dengue in vitro*

As células HepG2 ou BHK-21, cultivadas em frascos de cultura, foram tripsinizadas e a suspensão de células foi recolhida e adicionada à quantidade equivalente de meio MEM (Invitrogen) ou α -MEM (Invitrogen) respectivamente, suplementado com SFB (Invitrogen) 10%. A suspensão foi centrifugada a 500 x g por 10 minutos e a 4°C. Após este procedimento, as células foram ressuspensas em meio de cultura estéril suplementado com SFB 10%, plaqueadas em placas de 24 poços contendo ou não lamínulas e incubadas a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂.

Após 24 h, células HepG2 ou BHK-21 semiconfluentes foram infectadas, com MOI de 4 ou 10 respectivamente, pelo DENV-2, DENV-3 ou DENV inativado por aquecimento. A infecção foi realizada em meio de cultura sem SFB por 90 minutos. Ao término do período de adsorção, o inóculo viral foi retirado e foi adicionado às células, meio de cultura suplementado com SFB 2%. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, por 24 ou 48 h para posterior análise. Como controle da infecção, as células foram submetidas ao mesmo procedimento, porém ao invés de serem infectadas, foram incubadas com o mock.

Os macrófagos humanos foram extensivamente lavados para a remoção de células não aderidas. Em seguida, foram infectados pelo DENV-3 ou DENV-3 inativado, utilizando-se MOI de 4. A infecção foi realizada em meio de cultura DMEM (Invitrogen) sem soro humano. Após 3 h, o meio de cultura foi trocado e suplementado com soro humano autólogo 5% por 24 h, a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂. Ao término deste período, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -20°C para posterior quantificação de mediadores lipídicos. As células foram processadas de acordo com o tipo de análise. Como controle da infecção, os macrófagos humanos foram submetidos ao mesmo procedimento, entretanto ao invés de serem infectados, foram incubados com o mock.

A viabilidade celular durante a infecção foi determinada por ensaios de exclusão com o corante azul de tripan ou redução do composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT). As análises neste estudo foram realizadas com viabilidade celular \geq 90%.

3.7. *Tratamentos com inibidores do metabolismo lipídico*

Após o período de adsorção viral (90 minutos), as células HepG2 ou BHK-21 foram tratadas com diferentes concentrações de C75 (Cayman chemicals), um inibidor da enzima

ácido graxo sintase, ou triacsin C (Sigma), um inibidor da enzima acil-CoA sintetase, por 24 ou 48 h. Ambas as drogas foram ressuspendidas em DMSO (Sigma) estéril e na hora do uso diluídas em meio de cultura. As células infectadas e tratadas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A viabilidade celular na presença destas drogas foi determinada por ensaios de exclusão com o corante azul de tripan ou redução do composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) (Cell titer 96® Aqueous Non-Radioactive Cell proliferation Assay, Promega).

3.8. Infecção com o vírus reporter e análise da atividade da luciferase

As células BHK-21 foram infectadas com o DENV-2 carregando o gene reporter luciferase (DENV-R) (cedido pela Dra. Andrea Gamarnik; figura 2.1) e após o período de adsorção (90 minutos), tratadas com diferentes concentrações de C75 (Cayman chemicals). Os níveis de luciferase foram analisados 10, 24 e 48 h após a infecção. Em cada ponto, o meio de cultura foi removido e as células foram suavemente raspadas (*Cell scraper*, Nunc). Em seguida, foram lavadas, centrifugadas e lisadas através da adição de tampão de lise do kit da Promega. Foi utilizado um kit específico (*Dual-luciferase assay kit*, Promega), de acordo com as instruções do fabricante, para quantificar os níveis de luciferase. A atividade da luciferase foi determinada através do luminômetro (Turner BioSystems).

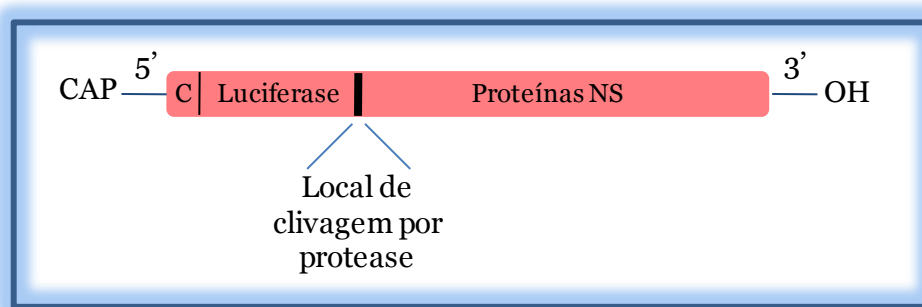


Figura 2.1. Representação esquemática do DENV-R. A sequência que codifica as proteínas estruturais foi substituída pela sequência que codifica a luciferase. Esta foi fundida aos primeiros 102 nucleotídeos da proteína C. Com o intuito de assegurar a liberação apropriada deste reporter a partir da poliproteína, o DENV-R carrega um local de clivagem específico (adaptada de Alvarez e cols., 2005).

3.9. PCR em tempo real

A extração do RNA de células BHK-21 ou HepG2 infectadas com o DENV-2 e tratadas com inibidores do metabolismo lipídico por 24 h foi realizada através da adição à cultura celular de 1mL do reagente Trizol® (Invitrogen). Após homogeneização, as amostras foram incubadas com 200µL de clorofórmio (Vetec) por 5 minutos e a 25°C, misturadas por 2 minutos e centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos e a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado pela adição de 700µL de álcool isopropílico (Vetec). As amostras foram mantidas a 25°C por 15 minutos e centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos e a 4°C. O precipitado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol (Vetec) 75% e, em seguida, centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos e a 4°C, secado em capela e dissolvido em 20µL de água livre de RNase. O RNA foi quantificado através de espectrofotômetro a 260/280 nm.

O cDNA foi sintetizado utilizando kit específico (*High-Capacity cDNA reverse transcription kit*, Applied Biosystems). Para isso, 5µg de cada amostra de RNA foi misturada com 2µL do tampão de transcrição reversa 10x, 0,8µL de dNTPs 25x, 2µL de iniciadores randômicos 10x, 1µL de transcriptase reversa MultiScribe™ e água livre de RNase para 20µL totais. As amostras foram mantidas a 25°C por 10 minutos e a 37°C por 2 h.

A PCR em tempo real foi realizada pelo sistema Taqman (Applied Biosystems) em termociclador (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems), utilizando-se iniciadores para a região não codificante 5' do DENV (*forward*: 5'-ATTAGAGAGCAGATCTCTG-3'; *reverse*: 5'-TGACACGCGGTTTC-3'; *probe*: 5'-TCAATATGCTGAAACGCG-3') nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos, 45°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto (Conceicao e cols., 2010).

3.10. Coloração e enumeração dos corpúsculos lipídicos

3.10.1 Por tetróxido de ósmio

As lamínulas contidas nas placas de 24 poços dos grupos controle (mock) ou infectados com o DENV (24 ou 48 h), tratados ou não, foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBS (pH 7,4) por 15 minutos. Em seguida, lavadas em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4), diluído em água Milli-Q, e fixadas em tetróxido de ósmio 1,5%, diluído em tampão cacodilato, por 30 minutos. Passado o tempo determinado, as lamínulas foram lavadas em água destilada e

tratadas com tiocarboidrazida 1% por 5 minutos. Posteriormente, foram lavadas em água destilada e tampão cacodilato 0,1 M e contrastadas em tetróxido de ósmio 1,5%. Após 3 minutos, foram lavadas novamente com água destilada e montadas com o meio “Aqua Polymount” (Vector). A morfologia das células fixadas foi observada e os corpúsculos lipídicos foram enumerados por microscópio de campo claro, em objetiva de imersão (100x), considerando-se um total de 50 células consecutivas por lâmina.

3.10.2 Por oil Red O

A coloração de corpúsculos lipídicos foi realizada com o corante de lipídios neutros, oil red O (ORO), onde as lamínulas contendo as células foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBS (pH 7,4) por 15 minutos e lavadas por três vezes com água destilada. Posteriormente, as lamínulas receberam propilenoglicol 100% durante 5 minutos, seguido de ORO 0,5% por 8 minutos. Em seguida, foram lavadas novamente com água destilada e cobertas com propilenoglicol 80% por 5 minutos. Passado o tempo determinado, as lamínulas foram lavadas por duas vezes com água destilada e coradas com hematoxilina. Após 30 segundos, foram lavadas novamente com água destilada e montadas com o meio “Aqua Polymount” (Vector). A morfologia das células fixadas foi observada e os corpúsculos lipídicos foram analisados por microscópio de campo claro, equipado com câmera digital, em objetiva de imersão (100x). As imagens foram processadas pelo programa “Image-Pro Plus software” (MediaCybernetics).

3.10.3 Por sonda lipídica fluorescente (BODIPY)

As lamínulas contendo as células foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBS (pH 7,4) por 15 minutos. Após esse período, foram lavadas por três vezes com PBS. Em seguida, incubadas com sonda lipídica fluorescente - BODIPY™ 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) (Molecular Probes) - (diluição final 1:500 em PBS) durante 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas por duas vezes com PBS e montadas com meio de montagem específico (Polysciences, Warrington, PA). As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência Olympus, equipado com câmera digital “Plan Cool-SNAP-Pro CF” em conjunção com “Image-Pro Plus software” (MediaCybernetics).

3.11. Ensaio de imunolocalização

3.11.1 Imunolocalização da proteína C associada à incorporação de sonda lipídica fluorescente

Células BHK-21 em cultura foram infectadas com o DENV-2 durante 24 h e fixadas em solução de 4% de formaldeído e 4% de sacarose em PBS (pH 7,4), por 20 minutos. Em seguida, lavadas por três vezes com PBS, tratadas com NH₄Cl 50mM por 10 minutos e lavadas por três vezes com PBS (2 minutos cada). As células, então, foram permeabilizadas em Triton X-100 0,1% em PBS por 4 minutos e lavadas por três vezes com PBS (2 minutos cada). Posteriormente, foram incubadas com gelatina 0,2% em PBS por 20 minutos, ou até 1 h, e depois mantidas em PBS durante 5 minutos. As células foram, então, incubadas por 1 h com anticorpo de coelho policlonal anti-proteína C (cedido pela Dra. Andrea Gamarnik) (diluição final 1:1000 em solução de gelatina 0,2% / PBS). Após cinco lavagens alternando PBS e solução de gelatina 0,2% / PBS (2 minutos cada), as células foram incubadas por 30 minutos com anticorpo de detecção Cy3 anti-coelho (Jackson Immuno Research) (diluição final 1:500 em solução de gelatina 0,2% / PBS). Para localização dos corpúsculos lipídicos, foi utilizada a sonda lipídica fluorescente BODIPY™ 493/503 (Molecular Probes) (diluição final 1:500 em PBS) durante 10 minutos. Passado o tempo determinado, as células foram lavadas por três vezes com PBS (2 minutos cada) e por fim, montadas com meio de montagem específico (Polysciences, Warrington, PA). As imagens foram obtidas através do microscópio confocal (Axioplan, Zeiss).

3.11.2 Imunolocalização do MIF associada à incorporação de sonda lipídica fluorescente

Macrófagos infectados ou não pelo DENV-3 *in vitro* por 24 h foram fixados em formaldeído 3% em PBS (pH 7,4) por 10 minutos. Posteriormente, foram lavados com PBS e permeabilizados em Triton X-100 0,2% por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e bloqueadas com soro de burro 2% em PBS por 15 minutos. As células foram, então, incubadas com o anticorpo policlonal anti-hMIF (R&D Systems), diluído na mesma solução de bloqueio na concentração final de 5 µg/mL, por 45 minutos. Após o período de incubação, as células foram lavadas por três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-cabra conjugado com o fluoróforo ALEXA 546 (Molecular Probes) diluído na solução de bloqueio a 1:1000, por 1 h. Para localização dos corpúsculos lipídicos foi utilizada a sonda BODIPY™ 493/503 (Molecular Probes) (diluição

final 1:200 em PBS) durante 10 minutos. Como controle da marcação do MIF, foi utilizado o soro de cabra (Jackson Laboratories) (diluição final 1:100) ao invés do anticorpo policlonal anti-hMIF. Por fim, as células foram lavadas por três vezes com PBS por 10 minutos e montadas em meio de montagem específico (Polysciences, Warrington, PA). As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência Olympus, equipado com câmera digital “Plan Cool-SNAP-Pro CF” em conjunção com “Image-Pro Plus software” (MediaCybernetics).

3.12. Ensaio de imunocitoquímica

Leucócitos humanos obtidos de pacientes infectados pelo DENV-3 foram fixados em formaldeído 3,7% em PBS (pH 7.4) por 10 minutos. Em seguida, foram permeabilizados em solução de saponina 0,05% em HBSS por 5 minutos e lavados com HBSS. As células foram, então, incubadas com anticorpo policlonal anti-hMIF ou IgG de cabra, diluídos em saponina 0,05% / HBSS, por 1 h. Após o período de incubação, as células foram lavadas por três vezes com saponina 0,05% / HBSS e incubadas com o anticorpo IgG anti-cabra conjugado à biotina (Sigma- Aldrich). A imunomarcação do MIF foi revelada utilizando o kit ABC Vectastatin glucose-oxidase, de acordo com as instruções do fabricante (Vector Laboratories). Por fim, as células foram observadas em microscópio de campo claro, equipado com câmera digital, em objetiva de imersão (100x). As imagens foram processadas pelo programa “ImagePro”.

3.13. Isolamento de corpúsculos lipídicos por fracionamento subcelular

Suspensões de células BHK-21 (5×10^7 células/3mL) infectadas com o DENV-2 foram centrifugadas a $500 \times g$ por 10 minutos e a 4°C , seguidas de ressuspensão em tampão TEE KCl (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM e KCL 100 mM) (pH 7,4). Este procedimento foi realizado durante três vezes para a lavagem das células. Posteriormente, foram adicionados inibidores de proteases (leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, benzamidina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pepstatina 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e fenil-metil-sulfonil-fluoride 0,1 mM) às suspensões de células e em seguida, estas foram submetidas ao rompimento através da cavitação em nitrogênio a 700 Ψ por 15 minutos e a 4°C . Os lisados foram coletados e centrifugados a 800 rpm por 5 minutos para a retirada do núcleo. Com cada homogenato foi realizado um gradiente de sacarose. O lisado foi misturado com o mesmo volume do tampão de sacarose 1,08 M e foram adicionados lentamente 2 mL do tampão de sacarose 0,27 M, 2 mL do tampão de sacarose 0,135 M e finalmente, 2 mL da solução tampão TEE KCl para a formação do gradiente. Os gradientes de

sacarose, então, foram centrifugados a 250.000 x g, por 1 h e 10 min e a 4°C. Sete frações foram coletadas do topo em direção ao fundo: corpúsculos lipídicos (frações 1 e 2), zona intermediária entre os corpúsculos lipídicos e o citosol (fração 3), citosol (frações 4 e 5) e microssoma e núcleo (frações 6 e 7). A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi medida como marcador citosólico, utilizando o kit CytoTox 96 (Promega). Em seguida, as proteínas do fracionamento subcelular foram concentradas por precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 10% a 4°C durante 1 h. Os precipitados foram lavados por duas vezes com acetona gelada. A dosagem de proteínas foi realizada utilizando o kit BCA (Pierce) para a análise do conteúdo protéico nas frações.

3.14. Western blotting

As proteínas obtidas do fracionamento subcelular ou do lisado de células foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE (em gel de poliacrilamida 15%) e transferidas para membrana de nitrocelulose umedecida em metanol utilizando tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8 e 20% de metanol em água Milli-Q). A transferência foi realizada a 17 Volts por 60 minutos em sistema semi-seco (Trans-Blot Semi Dry). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com solução bloqueadora de leite desnatado a 5% em TBST (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05 %). Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST e incubada por 1 h com o anticorpo policlonal anti-proteína C ou anticorpo anti-ADRP (Fitzgerald), ambos diluídos a 1:500 em TBST. Após este tempo, as membranas foram lavadas com TBST. As proteínas de interesse foram, então, identificadas pela incubação da membrana com anticorpos secundários anti-coelho (Pierce) ou anti-porquinho da Índia (Pierce) conjugados a peroxidase (HRP) e diluídos, em TBST na concentração de 1:5000 ou 1:6000, respectivamente. A detecção foi feita com o sistema de análise de “Western blotting Supersignal Chemiluminescence” (Pierce) e a membrana exposta a filme de autoradiografia (GE Healthcare).

3.15. Dosagem de PGE₂

Os níveis de PGE₂ nos sobrenadantes das culturas de macrófagos, infectados ou não pelo DENV-3, foram avaliados por ensaio imunoenzimático conforme as instruções do fabricante (Cayman Chemical, Inc). Placas de 96 poços foram cobertas com 200 µl de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo diluído em tampão fosfato de potássio (0,05 M) durante o período de uma noite. No dia seguinte, as ligações inespecíficas foram bloqueadas pela adição

de 200 µl de tampão fosfato de potássio (0,05 M) com BSA 1% e a placa foi mantida sob agitação por 4 h. Após este período, a placa foi lavada com Tween 20 a 0,05% em PBS (PBST). Em seguida, foram adicionados 50 µl das amostras previamente diluídas em *EIA Buffer* 1:200 ou 50 µl da PGE₂ na curva-padrão (1 ng/mL, 500, 250, 125, 63, 31 e 16 pg/mL diluídos em tampão fosfato de potássio 0,05 M com BSA 1%). O anticorpo anti-PGE₂ (50 µl) e a PGE₂ conjugada com colinesterase foram adicionados e incubados durante cerca de 16 h. Poços controle (branco) foram incluídos e receberam somente o tampão fosfato com 1% de BSA e a PGE₂ conjugada com colinesterase. Após esta etapa, a placa foi lavada por cinco vezes com PBST. Em seguida, foram adicionados 200 µl do reagente de Elmans, que contém o substrato para a enzima colinesterase (diluído em água Milli-Q, segundo instruções do fabricante), para revelar a reação. A placa foi mantida sob agitação durante 2 h e os resultados obtidos com a leitura a 405 nm na leitora de placa. Os dados foram analisados com o programa “Soft Max Pro”, e a dosagem baseada na respectiva curva-padrão.

3.16. *Análise estatística*

Os dados obtidos neste estudo foram representados como média e erro padrão da média (EPM) e avaliados estatisticamente através do teste de ANOVA e Newman-Keuls, considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

3.17. *Considerações sobre aspectos éticos*

Pacientes e voluntários sadios foram recrutados após aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (licenças número 058/98 e 539/09) e mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4. RESULTADOS

4.1. Leucócitos de pacientes com FHD apresentam aumento na formação de corpúsculos lipídicos

A formação de corpúsculos lipídicos pode ser desencadeada por vários estímulos inflamatórios e infecciosos (Bozza e cols., 2009). Desta forma, resolvemos investigar se as células provenientes de pacientes infectados pelo DENV apresentavam um aumento na formação destas organelas citoplasmáticas. Para isso, amostras sanguíneas obtidas de oito pacientes com FHD, causada pelo sorotipo 3, e sete voluntários sadios foram coletadas. Nossos resultados mostraram o aumento em número e tamanho dos corpúsculos lipídicos, contrastados por tetróxido de ósmio, em leucócitos isolados de pacientes infectados pelo DENV-3 (figura 4.1B) quando comparado com leucócitos isolados de voluntários sadios (figura 4.1A), através de microscopia de campo claro.

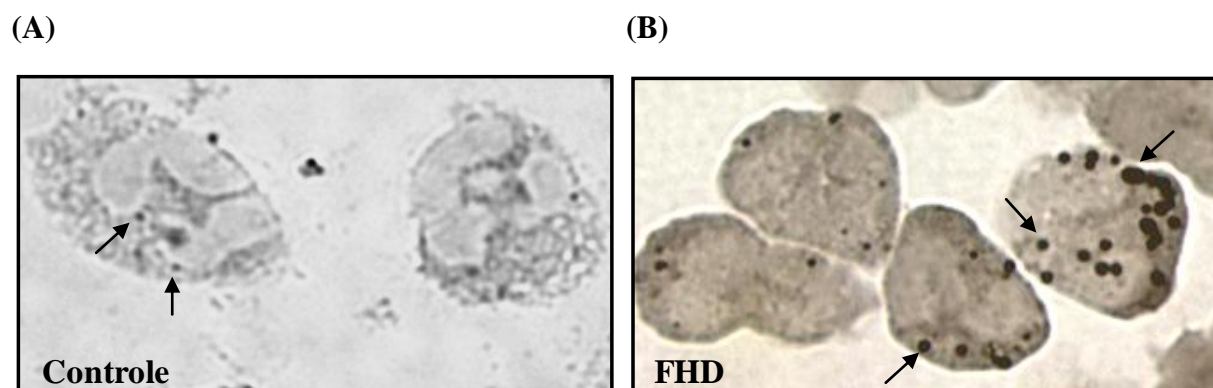


Figura 4.1. Imagem de leucócitos isolados de voluntários sadios ou pacientes com FHD. Leucócitos provenientes de voluntários sadios (A) ou pacientes com FHD (B), causada pelo sorotipo 3, foram contrastados com tetróxido de ósmio. Os corpúsculos lipídicos foram visualizados por microscópio de campo claro. A seta indica um corpúsculo lipídico observado como organela citoplasmática osmiofílica.

Ao quantificarmos os corpúsculos lipídicos, contrastados por tetróxido de ósmio, em leucócitos isolados de pacientes infectados, confirmamos o aumento na biogênese destas organelas quando comparado com leucócitos isolados de voluntários sadios (figura 4.2).

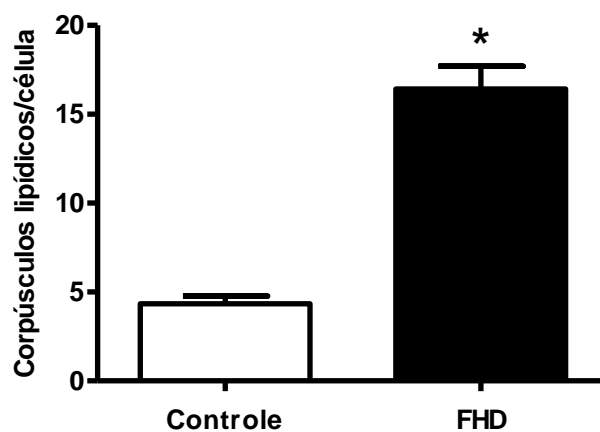


Figura 4.2. Análise quantitativa de corpúsculos lipídicos em leucócitos isolados de pacientes com FHD e voluntários sadios. Leucócitos periféricos foram isolados de 8 pacientes com FHD, causada pelo sorotipo 3, e 7 voluntários sadios. Após, foram contrastados com tetróxido de ósmio para a visualização e enumeração de corpúsculos lipídicos através do microscópio de campo claro. Cada barra representa a média \pm EPM de corpúsculos lipídicos por célula, considerando-se um total de 50 leucócitos consecutivos por lâmina. * diferença significativa entre os grupos controle e infectado; $p < 0,05$.

4.2. O DENV-3, mas não o DENV-3 inativado, induz a formação de corpúsculos lipídicos *in vitro*

Observações clínicas e experimentais indicam o envolvimento do fígado na infecção pelo DENV. Dados indicam que a permissividade celular seja modulada não apenas pelo sorotipo e cepa viral, mas também pelo próprio tipo celular (Seneviratne e cols., 2006). Além disso, foi observado que a fisiologia celular parece ser importante durante a infecção pelo DENV, uma vez que as células HepG2 na fase G2 do ciclo celular são mais susceptíveis à infecção e produzem altos títulos virais quando comparadas com células em outra fase (Phoolcharoen e Smith, 2004). As células HepG2 apresentam-se como um bom modelo para o estudo da infecção pelo DENV *in vitro*.

Para avaliarmos se o aumento na formação de corpúsculos lipídicos, observado em células de pacientes infectados, era reproduzido *in vitro*, células HepG2 foram infectadas com o DENV-3 por 24 h. Na figura 4.3B, os corpúsculos lipídicos, corados por oil red O, são visualizados em células HepG2 infectadas com o DENV-3 por microscopia de campo claro. Nas células HepG2 incubadas com o mock, a presença destas organelas era rara (figura 4.3A).

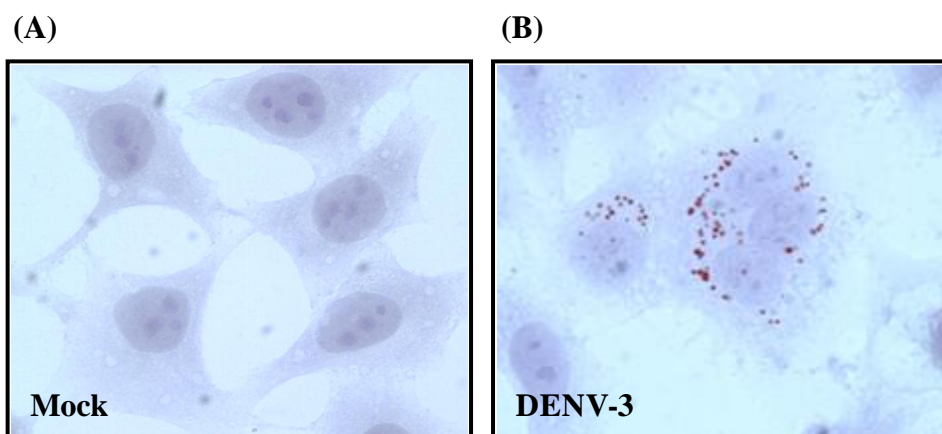


Figura 4.3. Imagem de células HepG2 infectadas ou não pelo DENV-3 *in vitro*. Células HepG2 foram cultivadas em triplicata com mock (A) ou infectadas com DENV-3 (B) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h, foram coradas com oil red O para análise dos corpúsculos lipídicos através do microscópio de campo claro.

Ao quantificarmos os corpúsculos lipídicos, contrastados por tetróxido de ósmio, em células HepG2 infectadas com DENV-3 ou DENV-3 inativado por aquecimento, durante 24 h, observamos que o DENV-3, mas não o DENV-3 inativado, foi capaz de induzir um aumento na formação destas organelas quando comparado com células não infectadas (figura 4.4).

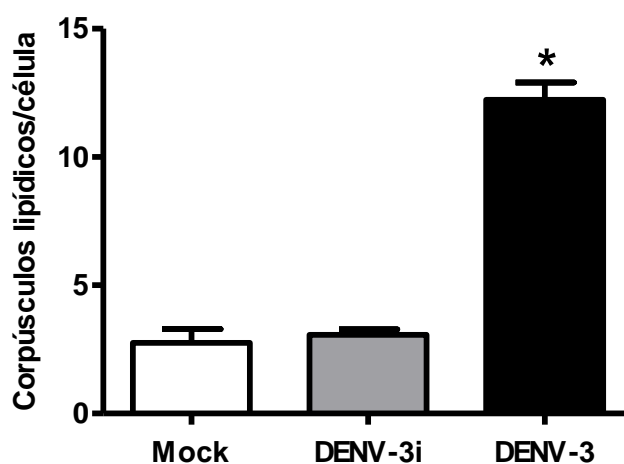


Figura 4.4. Efeito do DENV-3 na formação de corpúsculos lipídicos *in vitro*. Células HepG2 foram cultivadas em triplicata com mock, infectadas com DENV-3 inativado por aquecimento (DENV-3i) ou com DENV-3, MOI de 4, e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 h. Após este tempo, as células foram contrastadas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm EPM. * aumento significativo em relação às células não infectadas (mock) ou infectadas com o DENV-3i; $p < 0,05$.

4.3. O DENV-2, mas não o DENV-2 inativado, induz a formação de corpúsculos lipídicos *in vitro*

Com o intuito de avaliar se o DENV-2, assim como o DENV-3, era capaz de induzir um aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos *in vitro*, células HepG2 e BHK-21 foram infectadas com DENV-2 ou DENV-2 inativado por aquecimento durante 24 h. Nossos resultados indicam que o DENV-2, mas não o DENV-2 inativado, foi capaz de induzir um aumento na formação destas organelas quando comparado com células não infectadas (figura 4.5).

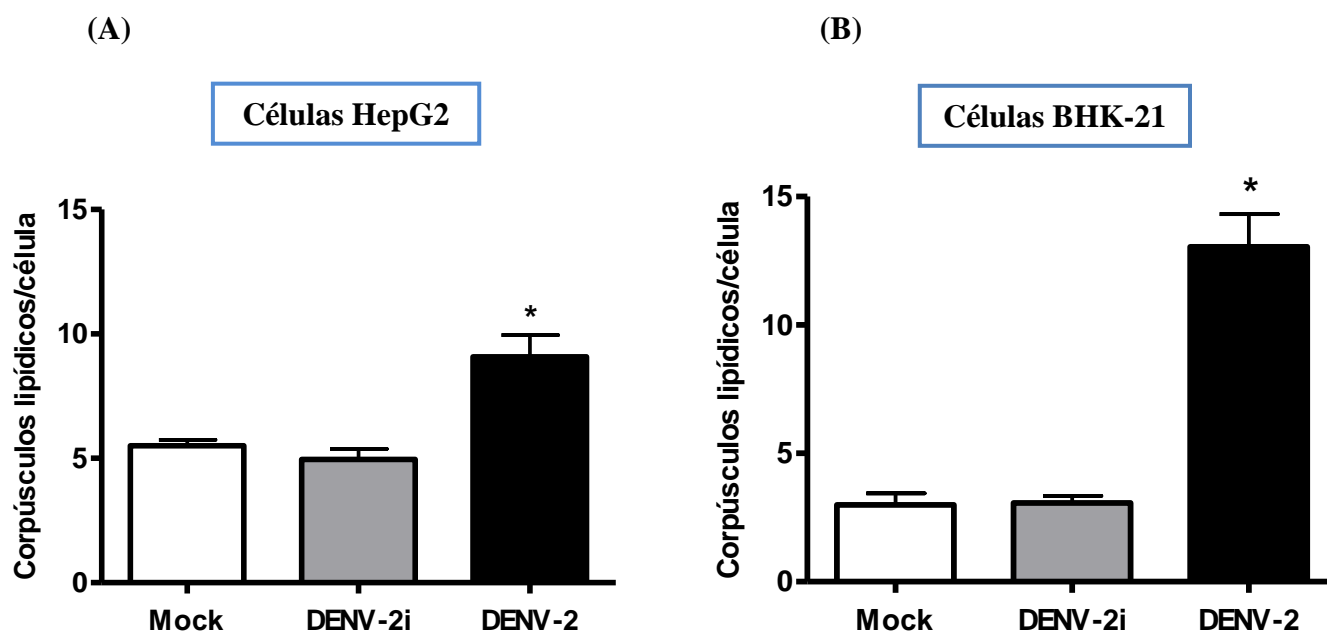


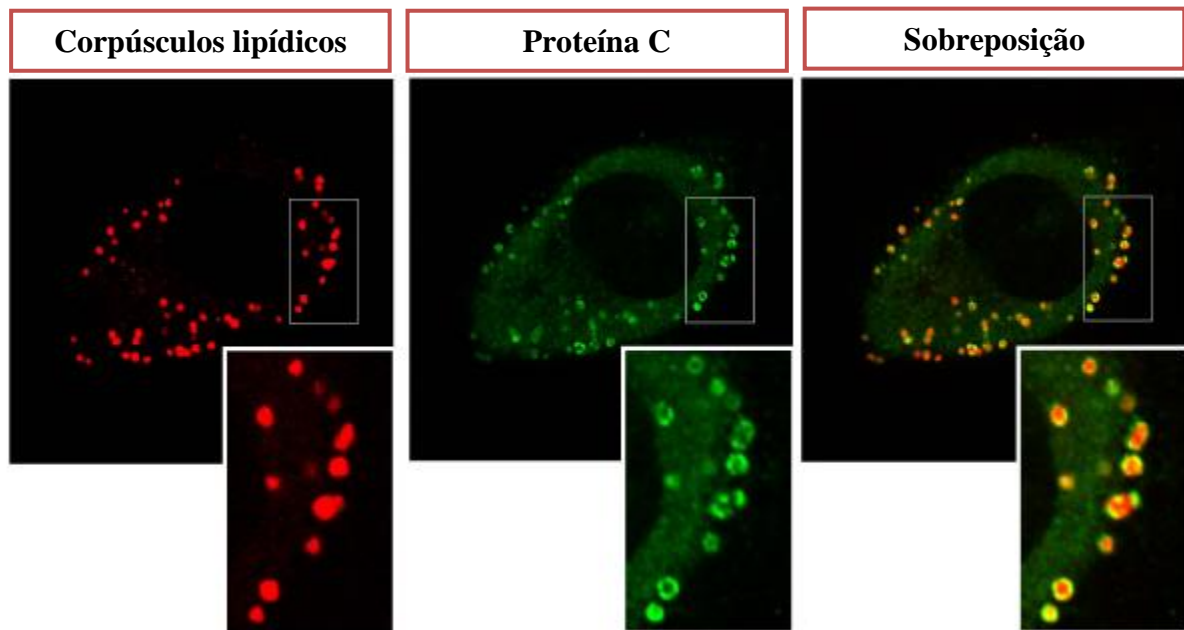
Figura 4.5. Efeito do DENV-2 na formação de corpúsculos lipídicos *in vitro*. Células HepG2 (A) ou BHK-21 (B) foram cultivadas em triplicata com mock, infectadas com DENV-2 inativado por aquecimento (DENV-2i) ou DENV-2 (MOI= 4 PFU/ HepG2 ou 10 PFU/ BHK-21) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h, as células foram contrastadas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± EPM. * aumento significativo em relação às células não infectadas (mock) ou infectadas com DENV-2i; $p < 0,05$.

4.4. A proteína do capsídeo do DENV-2 trafega para os corpúsculos lipídicos

Vários estudos têm demonstrado que algumas proteínas virais podem interagir especificamente com os corpúsculos lipídicos do hospedeiro, sendo este evento particularmente relevante durante a infecção pelo HCV, um membro pertencente à família do DENV. No entanto, as possíveis relações entre as proteínas do DENV e os corpúsculos lipídicos não foram avaliados e, portanto, resolvemos investigar este processo.

Através do ensaio de imunolocalização associado à incorporação de sonda lipídica fluorescente observamos uma interação significativa entre a proteína C do DENV-2 e os corpúsculos lipídicos das células BHK-21 (figura 4.6A). Visando confirmar este dado, isolamos os corpúsculos lipídicos destas células, através de fracionamento subcelular em gradiente de sacarose e demonstramos, por *Western blotting*, que a proteína C do DENV-2 estava localizada nas frações purificadas destas organelas (figura 4.6B).

(A)



(B)

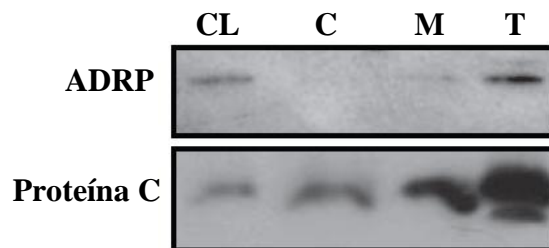


Figura 4.6. Localização dos corpúsculos lipídicos e da proteína C do DENV-2 nas células BHK-21. (A) Células BHK-21 foram infectadas com DENV-2 e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h, foram imunomarcadas com o anticorpo de coelho anti-proteína C revelado por anticorpo secundário Cy3 anti-coelho, coradas com sonda lipídica fluorescente (BODIPY™ 493/503) e analisadas por microscopia confocal. A sequência do painel mostra: BODIPY™, anti-proteína C e sobreposição dos corpúsculos lipídicos / proteína C do DENV-2. As cores das imagens de corpúsculos lipídicos e da proteína C foram invertidas. (B) Células BHK-21 foram infectadas com DENV-2 e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 h. Em seguida, foram submetidas ao fracionamento subcelular em gradiente de sacarose. As proteínas provenientes da fração de corpúsculos lipídicos, bem como de outras frações subcelulares, foram analisadas por *Western blotting*. O blot representa 3 experimentos independentes. CL: fração de corpúsculos lipídicos; C: fração citosólica; M: fração microssomal; T: extrato total.

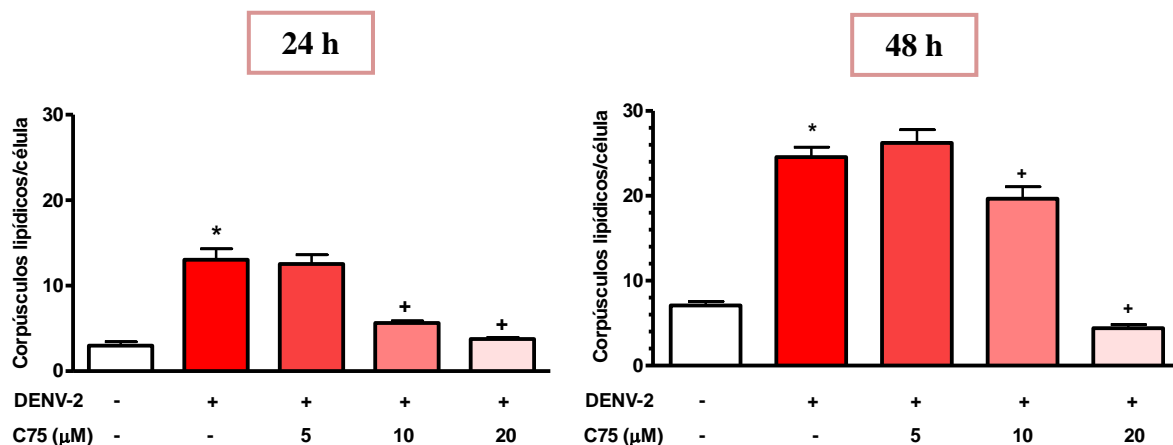
4.5. A formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 é bloqueada por inibidores do metabolismo lipídico

A biogênese de corpúsculos lipídicos, em diferentes tipos celulares, pode ser afetada por drogas capazes de inibir enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios (Fujimoto e cols., 2006; Accioly e cols., 2008). Deste modo, resolvemos estudar o efeito do C75 e triacsin C, drogas moduladoras da lipogênese, sobre a formação de corpúsculos lipídicos induzida durante a infecção pelo DENV.

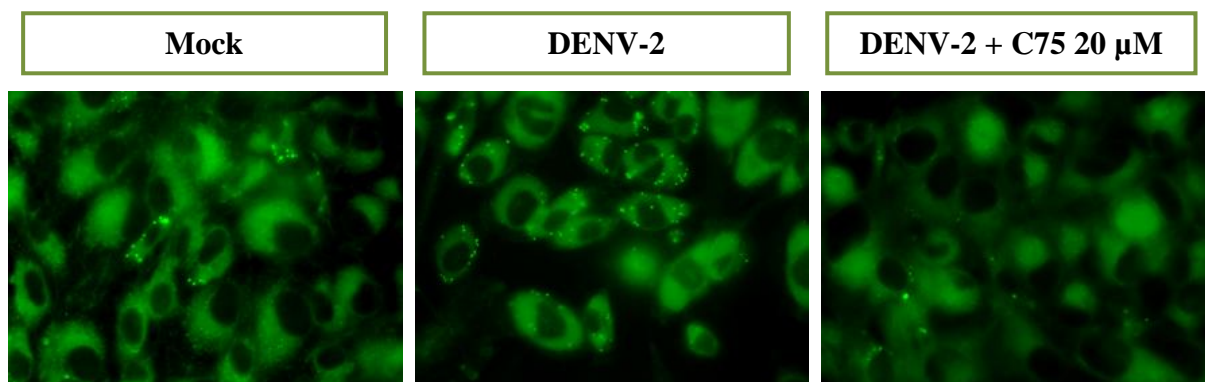
Células BHK-21 ou HepG2 foram infectadas com o DENV-2 *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de C75, um potente inibidor da enzima ácido graxo sintase, durante 24 ou 48 h. Nossos resultados inicialmente demonstraram que o DENV-2 foi capaz de induzir uma maior formação de corpúsculos lipídicos 48 h após a infecção das células BHK-21 quando comparado com o tempo de 24 h de infecção (figura 4.7A). O tratamento das células com esta droga promoveu uma redução significativa na formação destas organelas induzida pelo DENV-2 *in vitro* de uma maneira dose-dependente (figura 4.7). Durante a infecção das células HepG2, a concentração de 5 μM de C75 já era eficaz na redução da biogênese de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV-2 (figura 4.7C); enquanto que no caso das células BHK-21 era necessário pelo menos uma dose de 10 μM (figura 4.7A).

Em paralelo, observamos que células BHK-21 infectadas pelo DENV-2 *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de triacsin C, um inibidor da enzima acil-CoA sintetase, por 24h, apresentavam uma redução significativa na biogênese destas organelas induzida durante a infecção apenas na dose de 10 μM (figura 4.8).

(A)



(B)



(C)

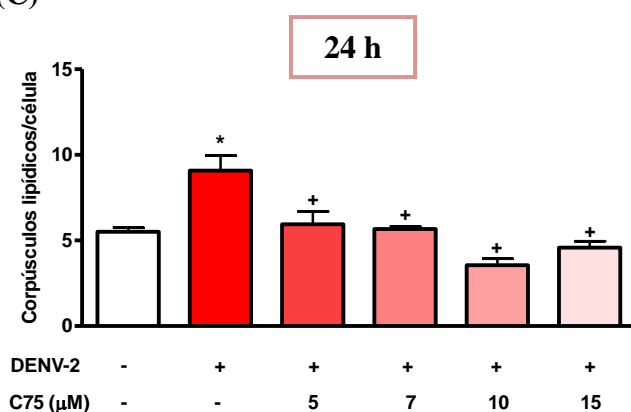


Figura 4.7. Análise de corpúsculos lipídicos em células infectadas pelo DENV-2 *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de C75. Células BHK-21 (A,B) ou HepG2 (C) foram cultivadas em triplicata com mock ou infectadas com DENV-2. Após o período de adsorção viral (90 minutos), o inóculo foi removido, as células foram tratadas com diferentes concentrações de C75 e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 (A,C) ou 48 h (A-B). Passado estes tempos, as células

foram contrastadas com tetróxido de ósmio (A,C) ou BODIPY™ (B). As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência, enquanto que a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± EPM. * aumento significativo em relação às células não infectadas (mock); + redução significativa em relação às células infectadas pelo DENV-2; $p < 0,05$.

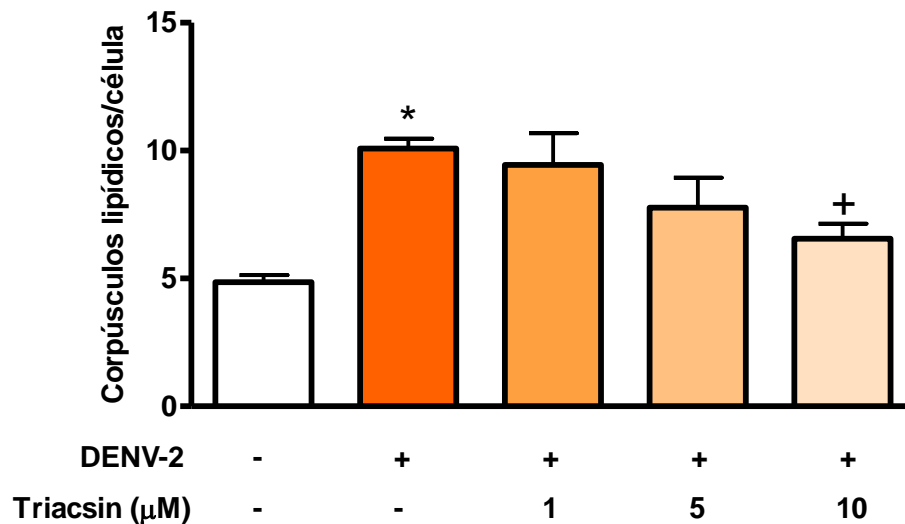


Figura 4.8. Análise quantitativa de corpúsculos lipídicos em células BHK-21 infectadas pelo DENV-2 *in vitro* e tratadas com diferentes concentrações de triacsin C. Células BHK-21 foram cultivadas em triplicata com mock ou infectadas com DENV-2. Após o período de adsorção viral (90 minutos), o inóculo foi removido, as células foram tratadas com diferentes concentrações de triacsin C e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 h. Passado este tempo, as células foram contrastadas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± EPM. * aumento significativo em relação às células não infectadas (mock); + redução significativa em relação às células infectadas pelo DENV-2; $p < 0,05$.

4.6. A inibição da formação de corpúsculos lipídicos tem impacto na capacidade replicativa do DENV-2

Para avaliarmos se a formação de corpúsculos lipídicos interfere na capacidade replicativa do vírus, utilizamos um replicon do DENV-2 cuja sequência codificadora das proteínas estruturais foi substituída pela sequência codificadora da luciferase. Construções de replicon contêm todos os elementos genéticos necessários para a amplificação em hospedeiros susceptíveis, porém não possuem a principal parte dos genes codificando proteínas estruturais. Os RNAs, conseqüentemente, replicam, mas não são empacotados em partículas virais. Sendo possível a distinção entre a tradução viral e a síntese de RNA devido a sua natureza não infecciosa, os replicons são considerados importantes ferramentas no estudo da replicação viral (Alvarez e cols., 2005; Ng e cols., 2007).

Para investigarmos o papel de drogas capazes de interferir na biogênese de corpúsculos lipídicos sobre a replicação viral, utilizamos células BHK-21 ou HepG2 infectadas com DENV-2 ou DENV-2 carregando o gene reporter luciferase (DENV-R) e tratadas com diferentes concentrações de C75 ou triacsin C, por 24 ou 48 h. Avaliamos a atividade da luciferase ou quantificamos as cópias virais por PCR em tempo real. Nossos resultados sugerem que o tratamento das células BHK-21, após o período de adsorção do DENV-R, com diferentes concentrações de C75 reduz a replicação viral em 24 e 48 h (figura 4.9A, segundo painel). No caso das células HepG2, após o período de adsorção do DENV-2 e tratamento com diferentes concentrações de C75 durante 24 h observamos a diminuição do número de cópias do RNA viral (Figura 4.9B). Em paralelo, ao tratarmos as células BHK-21, após o período de adsorção do DENV-2, com diferentes concentrações de triacsin C por 24 h, observamos também uma redução no número de cópias virais (figura 4.10).

Para confirmar se o C75 estava realmente afetando apenas a capacidade replicativa do vírus, e não a sua entrada ou tradução da poliproteína viral, analisamos a atividade da luciferase em um tempo mais curto (10 h). Observamos que não havia diferença significativa entre a atividade da luciferase nas duas doses de C75 utilizadas, sugerindo que esta droga esteja afetando, principalmente, a replicação do DENV-2 nestas células (figura 4.9A, primeiro painel).

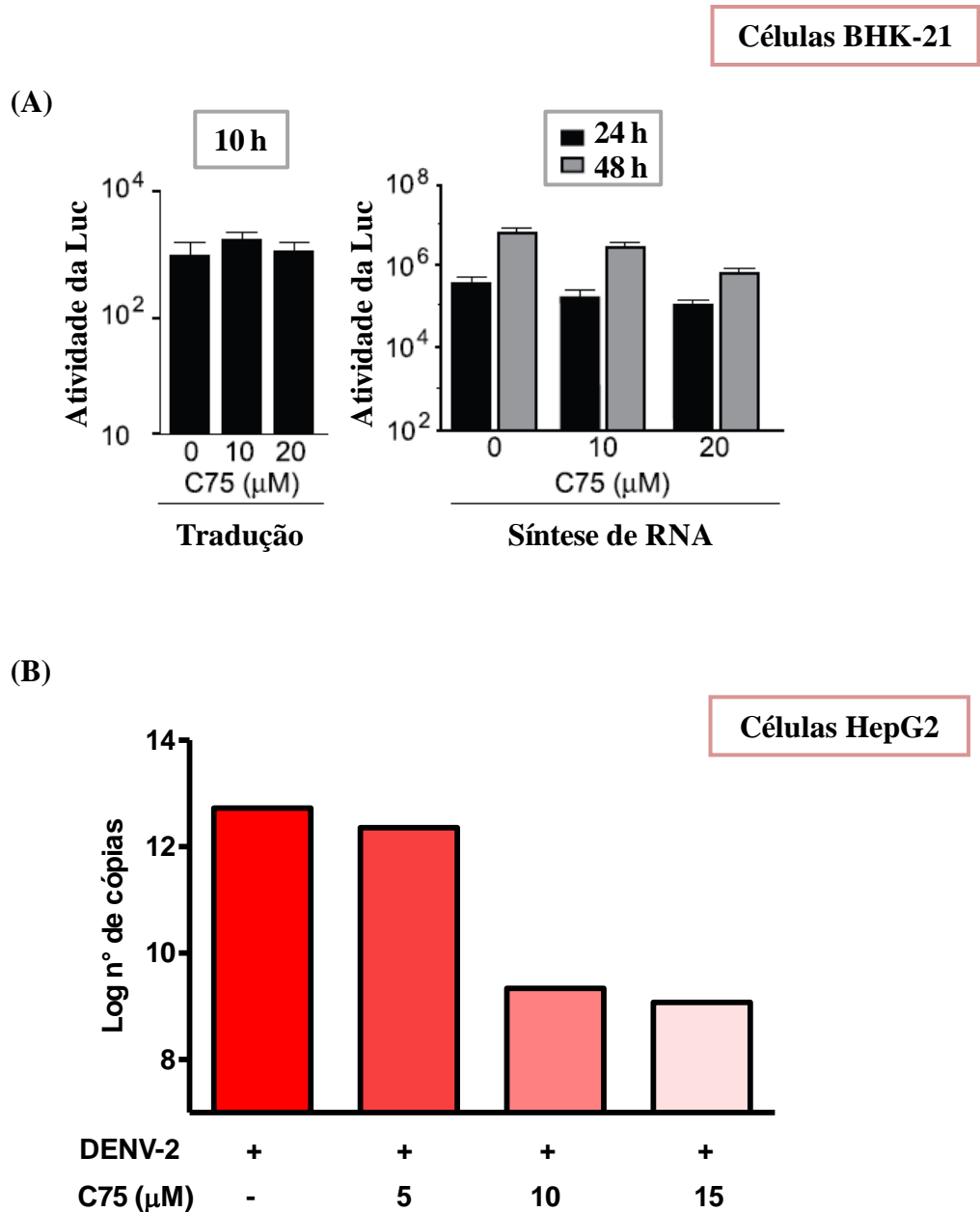


Figura 4.9. Efeito do C75 sobre a replicação do DENV-2. (A) Células BHK-21 foram infectadas com DENV-R e após o período de adsorção (90 minutos), tratadas com diferentes concentrações de C75. A atividade da luciferase foi detectada nos extratos citoplasmáticos obtidos destas células, após 10, 24 e 48 h de tratamento. O primeiro painel representa a avaliação da entrada e tradução do DENV-2 (10 h) e o segundo painel, a avaliação da síntese de RNA viral (24 e 48 h). (B) Células HepG2 foram infectadas com DENV-2 e após o período de adsorção, tratadas com diferentes concentrações de C75 por 24 h. O número de cópias virais foi quantificado através da técnica PCR em tempo real; n=2. Luc: Luciferase.

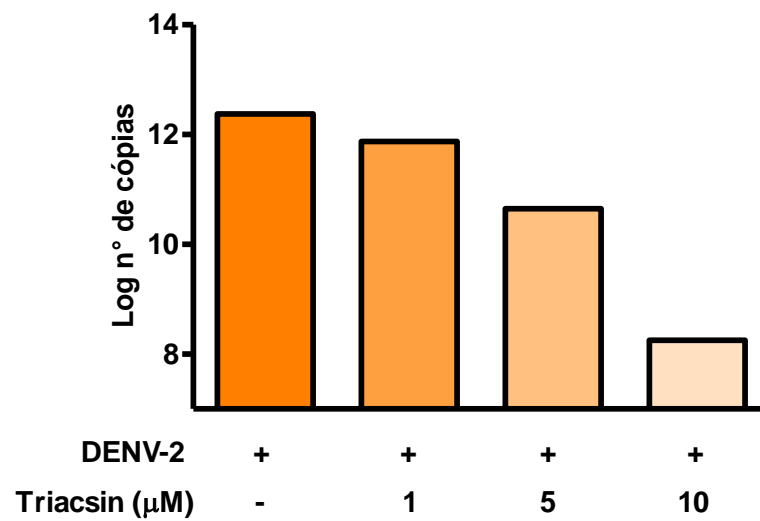


Figura 4.10. Efeito do triacsin C sobre a replicação do DENV-2. Células BHK-21 foram infectadas com o DENV-2 e após o período de adsorção, tratadas com diferentes concentrações de triacsin C por 24 h. O número de cópias virais foi quantificado através da técnica PCR em tempo real; n=2.

4.7. MIF em leucócitos de pacientes com FHD é estocado num padrão citoplasmático sugestivo de localização nos corpúsculos lipídicos

Diversos estudos demonstraram que a concentração de determinados mediadores inflamatórios encontrava-se significativamente aumentada durante a infecção pelo DENV. O MIF, uma citocina proinflamatória importante na modulação da resposta imunológica e inflamatória, é um deles e já foi demonstrado, através da análise do soro de pacientes infectados, que a sua concentração está diretamente relacionada com a gravidade da doença (Chen e cols., 2006; Assuncao-Miranda e cols., 2010).

Entretanto, os fatores determinantes da produção diferencial dos diversos mediadores, bem como os papéis de cada uma destas moléculas no complexo cenário fisiopatológico da dengue necessitam esclarecimento. Desta forma, resolvemos avaliar a relação entre o aumento no número dos corpúsculos lipídicos e a geração aumentada desses mediadores. Inicialmente, ao investigarmos a localização subcelular do MIF em leucócitos de pacientes com a forma grave da doença, através de imunocitoquímica, observamos que esta citocina estava estocada num padrão citoplasmático sugestivo de localização nos corpúsculos lipídicos (figura 4.11).

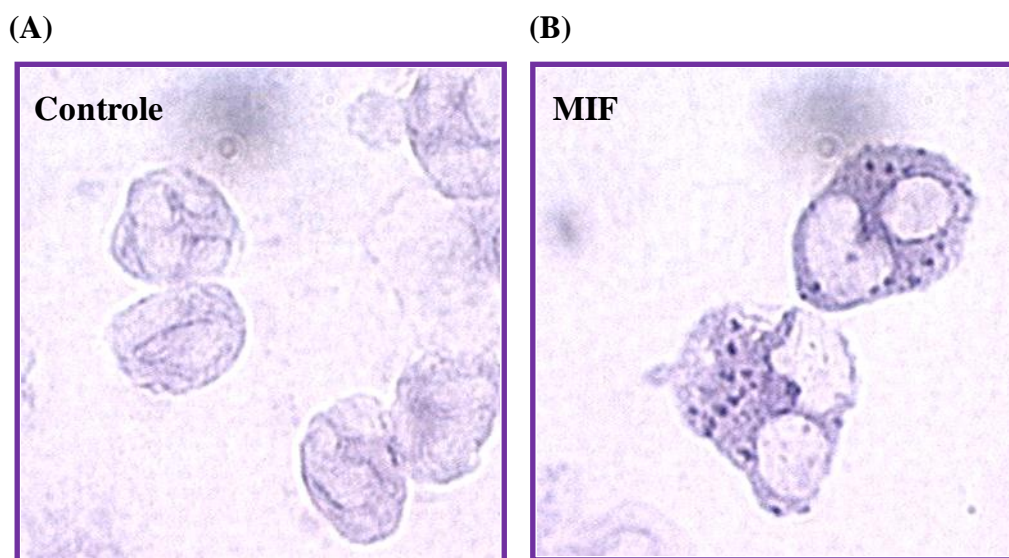


Figura 4.11: Localização subcelular do MIF em leucócitos isolados de pacientes com FHD. Leucócitos humanos obtidos de pacientes infectados com o DENV-3 foram incubados com anticorpo policlonal anti-hMIF (B) ou IgG de cabra (A). Em seguida, as preparações foram incubadas com IgG anti-cabra conjugado à biotina. A imunomarcagem do MIF foi revelada utilizando o kit ABC Vectastain glucose-oxidase e analisada através de microscopia de campo claro. O painel à esquerda mostra o controle, no qual foi utilizado anticorpo irrelevante ao invés do anticorpo primário específico, e o painel à direita mostra a localização do MIF.

4.8. O DENV-3 induz a compartimentalização do MIF nos corpúsculos lipídicos de macrófagos humanos

Para confirmar se o MIF realmente estava estocado nessas organelas citoplasmáticas durante a infecção pelo DENV, realizamos o ensaio de imunolocalização associado à incorporação de sonda lipídica fluorescente (BODIPY™ 493/503). A figura 4.12 mostra a localização da marcação de BODIPY (verde) e MIF (vermelho) na colocação (amarela), indicando que o MIF encontrava-se localizado nos corpúsculos lipídicos de macrófagos humanos infectados com o DENV-3 *in vitro* durante 24 h.

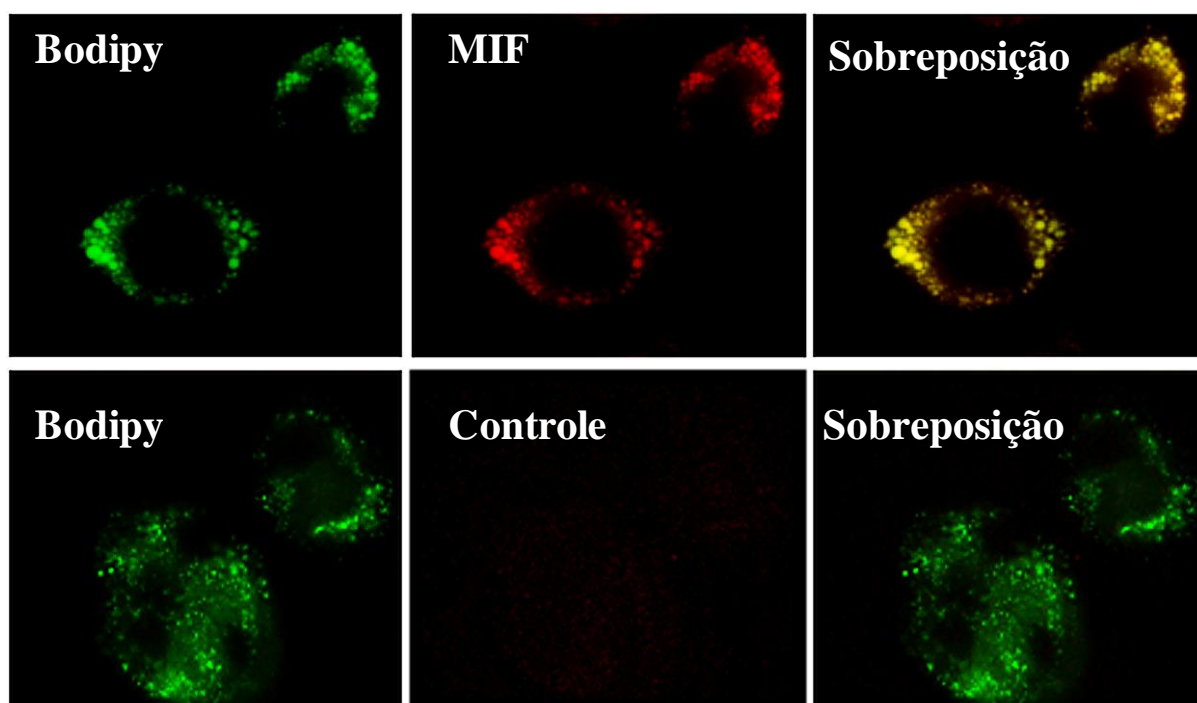


Figura 4.12. MIF é estocado nos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo DENV. Macrófagos humanos infectados com o DENV-3 *in vitro* durante 24h foram incubados com o anticorpo policlonal anti-hMIF ou IgG de cabra. Em seguida, as preparações foram incubadas com IgG anti-cabra conjugado com o fluoróforo ALEXA 546 e marcadas com sonda lipídica fluorescente BODIPY™ 493/503. As imagens foram obtidas através do microscópio de fluorescência. A sequência do painel superior mostra: corpúsculos lipídicos marcados com BODIPY, anti-hMIF e sobreposição das imagens; painel inferior: corpúsculos lipídicos marcados com BODIPY, controle do anticorpo primário (IgG de cabra) e sobreposição das imagens.

4.9. O DENV-3 induz aumento na formação de corpúsculos lipídicos e na geração de PGE₂ em macrófagos humanos *in vitro*

Os mediadores lipídicos desempenham papel central no desenvolvimento da resposta inflamatória, estando relacionados à patogênese de diversas doenças. Na infecção pelo DENV a prostaciclina (PGI₂) foi encontrada em elevada concentração no plasma de pacientes com FHD, particularmente durante choque (Preeyasombat e cols., 1999), enquanto o PAF e a PGD₂ foram produzidos por células mononucleares infectadas com o vírus (Yang e cols., 1995).

Avaliamos se a infecção pelo DENV-3, em macrófagos humanos, induzia a produção de PGE₂. Nossos resultados demonstraram que o DENV-3 é capaz de induzir um aumento na geração de PGE₂ em paralelo ao aumento na formação de corpúsculos lipídicos (figura 4.13).

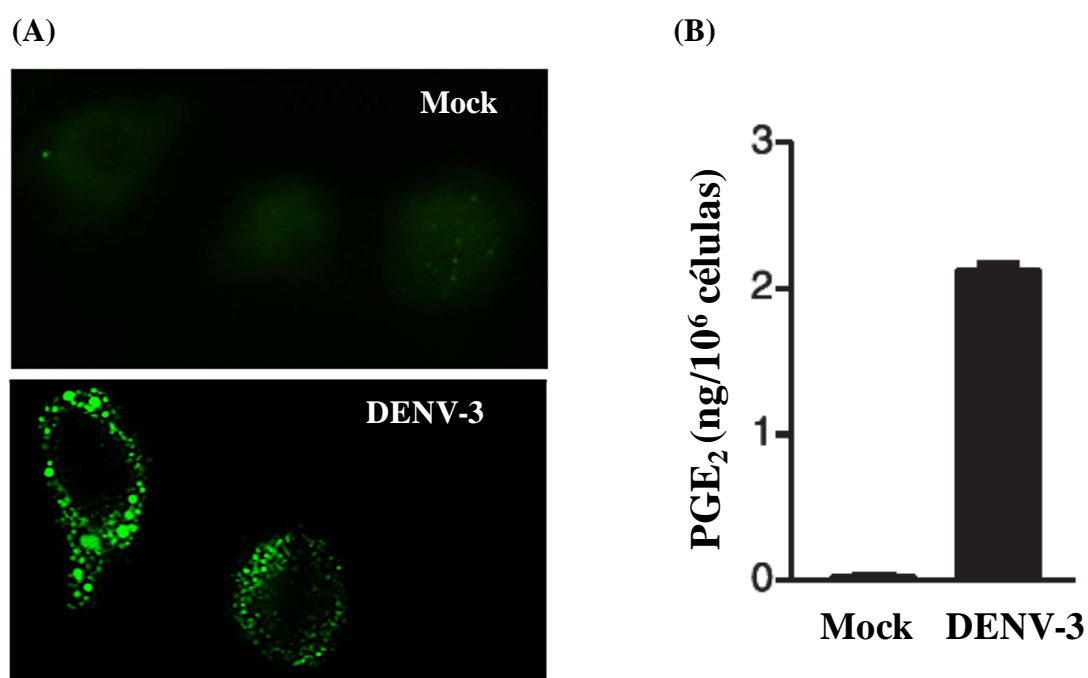


Figura 4.13. O DENV-3 induz a formação de corpúsculos lipídicos e a geração de PGE₂ em macrófagos humanos *in vitro*. (A) Macrófagos humanos cultivados com mock ou infectados com DENV-3 *in vitro*, durante 24 h, foram corados com BODIPY™ 493/503 e analisados por microscópio de fluorescência. (B) Os sobrenadantes de macrófagos humanos cultivados com mock ou infectados com DENV-3 *in vitro* foram coletados 24 h após a infecção e submetidos à dosagem de PGE₂ através de ensaio imunoenzimático (EIA).

5. DISCUSSÃO

O acúmulo intracelular de lipídios em corpúsculos lipídicos está associado a infecções clínicas e experimentais, neoplasias e diversas condições inflamatórias. Avanços recentes indicam que estas organelas não atuam apenas como depósitos de lipídios, mas também como estruturas dinâmicas altamente reguladas que possuem funções como domínios citoplasmáticos envolvidos no metabolismo e tráfego lipídico, na sinalização e ativação celular, bem como no controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (Bozza e cols., 2009).

Parece que o papel exercido pelos corpúsculos lipídicos, durante processos infecciosos, os torne alvo bastante interessante para determinados patógenos, especialmente àqueles que modulam processos celulares do hospedeiro a fim de facilitar a replicação e, conseqüentemente, a sobrevivência dos mesmos. De fato, isto pareceu ser relevante durante a infecção pelo HCV, um membro pertencente à família do DENV, onde estas organelas mostraram-se envolvidas na associação com proteínas virais, replicação e produção de partículas infecciosas (Miyanari e cols., 2007; Targett-Adams e cols., 2008a; Targett-Adams e cols., 2008b).

Na literatura atual, apesar de muitos estudos terem documentado o papel dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo HCV, não encontramos referências sobre o envolvimento destas organelas durante a infecção pelo DENV. Desta forma, este trabalho visa mostrar, pela primeira vez, a biogênese e função dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo DENV, com foco na interação com proteínas virais, modulação da capacidade replicativa e/ou infecciosa do vírus e geração aumentada de mediadores inflamatórios.

Nossos resultados mostraram que leucócitos isolados de pacientes com a forma grave da doença, causada pelo sorotipo 3, apresentavam um aumento no número de corpúsculos lipídicos quando comparado com leucócitos obtidos de voluntários sadios. Nos estudos *in vitro* demonstramos que este fenômeno era reproduzido, uma vez que a infecção de macrófagos humanos ou células HepG2 com o DENV-3, durante 24 h, foi capaz de induzir a biogênese destas organelas quando comparada com células incubadas com o mock. De forma interessante, o aumento na formação de corpúsculos lipídicos observado durante a infecção não era dependente do sorotipo, já que o DENV-2 também foi capaz de estimular a gênese destas estruturas em células BHK-21 ou HepG2, após 24 ou 48 h de infecção *in vitro*, quando comparada com células incubadas com o mock. Outro ponto curioso deste estudo foi a observação de que o vírus inativado por aquecimento não promovia à formação destas organelas *in vitro*, sugerindo que este evento dependa da integridade viral.

Sendo assim, os dados obtidos propõem que o aumento na formação dos corpúsculos lipídicos induzido pelo DENV dependa de uma infecção produtiva, visto que o DENV

inativado por aquecimento falhou em induzir estas estruturas. Entretanto, foi demonstrado que a biogênese de corpúsculos lipídicos independe de uma infecção produtiva quando o estímulo é o BCG, já que a micobactéria morta por aquecimento leva à indução da formação destas organelas com a participação do TLR2 (D'Avila e cols., 2006). É possível, portanto, que as mudanças conformacionais induzidas na glicoproteína E do DENV prejudicam a interação do vírus com um possível receptor na membrana celular que seja capaz de promover ou facilitar a sua internalização, além de desencadear uma cascata de sinalização que culmine na gênese dos corpúsculos lipídicos.

Através da análise da expressão do mRNA de receptores envolvidos no reconhecimento de moléculas específicas derivadas de microorganismos, foi demonstrado que a infecção pelo DENV promovia um aumento na expressão do mRNA de TLR3, TLR8, RIG-I e MDA5, sugerindo que o vírus poderia ser reconhecido pelos mesmos (Conceicao e cols., 2009). Deste modo, não podemos descartar a hipótese de que o RNA do DENV ao ser reconhecido por tais receptores desencadeie sinalização intracelular que culmine na biogênese de corpúsculos lipídicos observada durante a infecção.

Assim, os mecanismos que regulam a formação destas organelas durante a infecção pelo DENV ainda precisam ser esclarecidos. Embora não existam inibidores específicos para os corpúsculos lipídicos, diversos estudos demonstraram que diferentes classes de drogas são capazes de bloquear a formação destas organelas dinâmicas. Desta forma, para confirmar esta hipótese, utilizamos inibidores de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios, o C75 e o triacsin C. Ambas as drogas já haviam sido reportadas como inibidoras da formação destas estruturas em distintos tipos celulares (Fujimoto e cols., 2006; Accioly e cols., 2008). Portanto, ao analisarmos o efeito destes inibidores sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos, em diferentes tipos celulares, observamos uma redução significativa na formação destas organelas induzida durante a infecção pelo DENV.

Estes resultados fortemente sugerem que a gênese de corpúsculos lipídicos induzida durante a infecção pelo DENV ocorra de uma forma dependente das enzimas ácido graxo sintase e acil-CoA sintetase. Recentemente, foi demonstrado que durante a infecção há um aumento na atividade da enzima ácido graxo sintase e, conseqüentemente, na biogênese de lipídios (Heaton e cols., 2010); no entanto, este estudo não investigou a formação e/ou o papel dos corpúsculos lipídicos durante este processo. A fim de promover o aumento de constituintes lipídicos importantes no estabelecimento de uma replicação viral eficiente, o HCV promove a ativação da enzima ácido graxo sintase (Yang e cols., 2008), do fator de transcrição SREBP (Waris e cols., 2007) e dos receptores nucleares PPAR γ (Kim e cols., 2007; Kim e cols., 2009) e LXR (Lima-Cabello e cols., 2010). Sendo assim, uma vez que os

nossos resultados demonstraram que a inibição de enzimas envolvidas na síntese de lipídios prejudica a formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo DENV, estudos que incluem a análise de receptores nucleares e fatores de transcrição envolvidos na lipogênese são necessários para desvendar os mecanismos que regulam a biogênese destas organelas.

É possível que a infecção como um todo contribua para a gênese dos corpúsculos lipídicos. Estudos demonstraram que durante a infecção pelo DENV há a produção de diversos mediadores inflamatórios e, portanto, acreditamos que alguns destes possam atuar em sinergismo com o vírus para promover a formação destas estruturas citoplasmáticas.

Dados do nosso grupo mostraram que o PAF e moléculas semelhantes ao PAF, mas não o liso-PAF, promovem a biogênese de corpúsculos lipídicos de maneira dependente do seu receptor acoplado a proteína G e sinalização abaixo deste, que inclui a ativação da 5-LO, PKC e fosfolipase C (PLC), num mecanismo que pode envolver uma alça autócrina na geração de CCL2 (Bozza e cols., 1996a; Bozza e cols., 1997; Bozza e cols., 1998; de Assis e cols., 2003). Adicionalmente, demonstramos que a quimiocina MCP-1 estava envolvida, durante inflamação induzida por LPS ou sepse experimental, na regulação da gênese destas organelas em macrófagos, de uma forma dependente do seu receptor CCR2, da sinalização envolvendo MAPK e PI3K, bem como da dinâmica microtubular (Pacheco e cols., 2007). Além disso, nosso grupo recentemente observou que o MIF é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos, sendo este processo dependente do seu receptor CD74, da eotaxina e o receptor CCR3 (Vieira-de-Abreu e cols., 2010). Tendo em vista que estes mediadores inflamatórios se encontram em níveis elevados durante a infecção pelo DENV (Yang e cols., 1995; Chen e cols., 2006; Fink e cols., 2006; Lee e cols., 2006; Souza e cols., 2009; Assuncao-Miranda e cols., 2010) é razoável que eles possam estar envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos, porém esta hipótese ainda precisa ser investigada.

Além destas suposições, outra possibilidade é a de que proteínas virais, uma vez no citoplasma das células hospedeiras, também sejam capazes de desencadear uma cascata de sinalização intracelular que levaria à formação destas organelas dinâmicas. Durante a infecção pelo HCV, foi observado que a proteína C promovia um aumento no tamanho e densidade dos corpúsculos lipídicos em células hepáticas (Lyn e cols., 2010). De fato, nossos resultados mostraram que a transfecção de células BHK-21 com um vetor de expressão que codifica a forma madura da proteína C do DENV promovia a indução da formação destas estruturas quando comparada com células BHK-21 transfectadas com um vetor controle. Porém, esta indução foi menor do que aquela observada durante a infecção com o DENV-2 *in vitro* (Samsa e cols., 2009), sugerindo que outros fatores virais ou a infecção em si estejam envolvidos na alteração do metabolismo lipídico do hospedeiro.

A proteína C do DENV é básica, possui 12 kDa e forma homodímeros em solução (Jones e cols., 2003; Wang e cols., 2004). Através da técnica de ressonância magnética nuclear, sua estrutura tridimensional foi resolvida e o estudo indicou que o monômero é composto por quatro hélices α ($\alpha 1$ a $\alpha 4$). As três primeiras hélices ($\alpha 1$ a $\alpha 3$) constituem a parte central do monômero, enquanto a $\alpha 4$, a hélice mais longa, estende-se além da parte central e possui uma alta densidade de resíduos básicos na sua superfície, que foram propostos na interação com o RNA viral. No lado oposto da molécula, foi sugerido que a superfície formada por $\alpha 2$ - $\alpha 2'$ e $\alpha 1$ - $\alpha 1'$, não carregada, interage com membranas (Ma e cols., 2004). A região hidrofóbica interna, composta pelos resíduos 46 a 66, inclui as hélices $\alpha 2$ e $\alpha 3$ (Markoff e cols., 1997). Apesar da proteína C ser a menos conservada dentre as proteínas dos flavivírus, as propriedades estruturais e a distribuição das cargas são bastante similares.

As proteínas C dos três gêneros pertencentes à família *Flaviviridae* não exibem homologia significativa na sequência ou organização comum de domínios. Todavia, todas são diméricas, básicas, possuem arranjo helicoidal e são responsáveis pelo empacotamento do genoma viral (Ivanyi-Nagy e Darlix, 2010). As proteínas C maduras dos hepacivírus possuem aproximadamente 170 aminoácidos de comprimento e consistem de dois domínios, o domínio N-terminal altamente básico (D1) e o domínio C-terminal hidrofóbico (D2) (Boulant e cols., 2005). Contudo, as proteínas C dos pesti- e flavivírus são menores, com 90 a 100 resíduos e sem o domínio D2. Nos últimos anos, evidências sugerem que a formação do HCV requer a associação da proteína C aos corpúsculos lipídicos e que o domínio D2 era responsável por tal interação (Barba e cols., 1997; Hope e McLauchlan, 2000; McLauchlan e cols., 2002; Boulant e cols., 2006; Boulant e cols., 2007; Miyanari e cols., 2007; Shavinskaya e cols., 2007; Boulant e cols., 2008). Já que este domínio não está presente nas proteínas C do gênero *Flavivirus*, uma associação da proteína C do DENV com os corpúsculos lipídicos não era esperada.

Estudos reportaram que a proteína C encontrava-se localizada tanto no citoplasma quanto no núcleo de células infectadas pelo DENV. A localização nuclear foi cuidadosamente analisada por diversos grupos de pesquisa (Wang e cols., 2002; Sangiambut e cols., 2008). Ao contrário, há poucas informações sobre a distribuição desta proteína no citoplasma de células infectadas, local onde ocorre o empacotamento do RNA viral.

Ao investigarmos a localização da proteína C do DENV-2, utilizando para isso condições apropriadas capazes de manter a integridade dos corpúsculos lipídicos, demonstramos que esta proteína encontrava-se localizada nos corpúsculos lipídicos das células BHK-21 após 24 h de infecção. Este evento também foi observado em outros tipos celulares (Samsa e cols., 2009) Além disso, constatamos que a associação da proteína C a estas organelas se dava

através de resíduos hidrofóbicos específicos presentes na hélice $\alpha 2$, visto que substituições de dois aminoácidos (L50 e L54) desta hélice impediram a interação da proteína C com os corpúsculos lipídicos. Em contrapartida, mutações nos resíduos não carregados presentes na hélice $\alpha 1$ ou entre as hélices $\alpha 1$ e $\alpha 2$ não alteraram a interação entre esta proteína e os corpúsculos lipídicos (Samsa e cols., 2009).

Assim, o acúmulo da proteína C ao redor dos corpúsculos lipídicos propõe que estas organelas possam estar regulando temporariamente o processo viral através da regulação da disponibilidade desta proteína no citoplasma. A nossa hipótese é de que a interferência na formação de corpúsculos lipídicos possa ser um método de intervenção antiviral. Dessa forma, ao investigarmos o papel do C75 e triacsin C sobre a replicação do DENV, observamos que havia uma redução deste processo. Em seguida, para verificarmos qual etapa do ciclo de replicação estava sendo afetada após o tratamento das células, utilizamos o DENV-R. Nossos resultados mostraram que 10 h após a infecção, os níveis de luciferase não haviam sido alterados pelo inibidor C75, sugerindo que esta droga não esteja interferindo na entrada ou tradução viral. No entanto, 24 ou 48 h após a infecção, observamos uma redução nos níveis de luciferase, que corresponde à redução na amplificação do RNA do DENV.

O sobrenadante das células tratadas durante 48 h após a infecção foi coletado e, em seguida, utilizado para infectar células frescas na ausência do inibidor. Observamos, 48 h após a infecção, uma inibição na formação de partículas virais (Samsa e cols., 2009) e, portanto, nossos resultados sugerem que alterações no metabolismo dos corpúsculos lipídicos possam representar uma forma de bloquear a replicação do DENV.

Corroborando os resultados obtidos da importância destas organelas citoplasmáticas na replicação do DENV, investigamos o efeito das mutações na proteína C sobre este processo através da transfecção de células com os RNAs mutantes ou selvagem. Verificamos que mutações em aminoácidos hidrofóbicos localizados na hélice $\alpha 2$, necessários para a associação da proteína C aos corpúsculos lipídicos, impediram a formação de partículas virais infecciosas. Entretanto, mutações em aminoácidos não carregados presentes na hélice $\alpha 1$ ou entre as hélices $\alpha 1$ e $\alpha 2$, que não alteraram a interação entre a proteína C e estas organelas dinâmicas, não modificaram a propagação do DENV (Samsa e cols., 2009). Uma explicação plausível para estas observações seria que a proteína C, não localizada nos corpúsculos lipídicos, poderia se ligar a outros fatores envolvidos na replicação ou acumular no citoplasma e interagir prematuramente com o RNA viral, interferindo, portanto, na amplificação do genoma.

Estes resultados estão de acordo com um estudo prévio, no qual a deleção de alguns resíduos presentes na hélice $\alpha 2$ da proteína C do DENV prejudicou a propagação viral (Zhu e

cols., 2007). Baseado nos nossos resultados, aminoácidos hidrofóbicos presentes na hélice α_2 da proteína C do DENV poderiam atuar como o domínio C-terminal D2 dos hepacivírus, no que diz respeito à associação da proteína viral aos corpúsculos lipídicos. Portanto, hepacivírus e flavivírus utilizam aspectos estruturais distintos para a localização subcelular da proteína C, sugerindo uma evolução convergente destas proteínas virais.

Os mecanismos envolvidos no recrutamento do RNA viral pela proteína C para formar o nucleocapsídeo ainda não foram completamente elucidados. Uma vez que ocorre a transferência de proteínas e lipídios entre o RE e os corpúsculos lipídicos (Thiele e Spandl, 2008), é possível que inicialmente durante a infecção, a proteína C esteja armazenada nestas organelas para em seguida ser mobilizada à membrana do RE, onde a morfogênese da partícula viral tem início. Alternativamente, o RNA do DENV poderia interagir com a proteína C na superfície dos corpúsculos lipídicos, culminando na formação do nucleocapsídeo que seria, então, transferido à membrana do RE para a formação de partículas virais.

Acreditamos que durante a infecção estas organelas dinâmicas e funcionalmente ativas atuam não apenas como plataforma para a replicação viral, mas também na geração aumentada de mediadores inflamatórios. Isto porque a relação entre a formação de corpúsculos lipídicos e o aumento na síntese de eicosanóides – família de lipídios derivados do ácido araquidônico e que controlam processos celulares importantes, como apoptose, proliferação, metabolismo e migração celular – derivados da 5-LO e COX (LTC_4 , LTB_4 e PGE_2) foi observada por diversos grupos de pesquisa, incluindo o nosso, tanto *in vitro* (Bozza e cols., 1996a; Bozza e cols., 1996b; Bozza e cols., 1997; Bozza e cols., 1998; Bartemes e cols., 1999; Weller e cols., 1999; Pacheco e cols., 2007) quanto *in vivo* (Pacheco e cols., 2002; Silva e cols., 2002; de Assis e cols., 2003; Melo e cols., 2003; Vieira-de-Abreu e cols., 2005; Maya-Monteiro e cols., 2008). Entretanto, esta relação em associação com a detecção de enzimas formadoras de mediadores lipídicos nos corpúsculos lipídicos não eram suficientes para afirmar que os eicosanóides eram sintetizados nestas organelas durante processos inflamatórios ou infecciosos. Desta forma, nosso grupo demonstrou, através de uma técnica que permite a fixação destes mediadores nos seus locais de síntese, que os corpúsculos lipídicos de leucócitos ativados atuam como locais de síntese de LTC_4 , LTB_4 e PGE_2 (Bandeira-Melo e cols., 2001b; Bandeira-Melo e cols., 2002a; Vieira-de-Abreu e cols., 2005; D'Avila e cols., 2006; Pacheco e cols., 2007).

Outro grupo de mediadores inflamatórios identificado nos corpúsculos lipídicos foram as citocinas – família de glicoproteínas envolvidas na inflamação, imunidade, proliferação, diferenciação e reparo celular. Citocinas como o TNF- α (Beil e cols., 1995; Pacheco e cols.,

2002) e quimiocinas como a RANTES e a IL-16 (Lim e cols., 1996) foram detectadas nestas organelas de leucócitos ativados. Entretanto, ainda não foi elucidado como estes mediadores são liberados destas organelas e/ou se eles possuem capacidade de sinalização nestas estruturas.

Investigamos se o MIF – mediador proinflamatório cuja concentração estava diretamente relacionada à gravidade da doença – encontrava-se estocado nos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo DENV. Nossos resultados demonstraram que esta citocina, em leucócitos obtidos de pacientes com a forma grave da doença, estava localizada em inclusões citoplasmáticas compatíveis com os corpúsculos lipídicos. Para confirmar esta observação, utilizamos a técnica de imunolocalização associada à incorporação de sonda lipídica fluorescente e condições de fixação e permeabilização celular apropriadas, que previnem a dissolução destas organelas. Desta maneira, constatamos que o MIF encontrava-se estocado nos corpúsculos lipídicos de macrófagos humanos infectados pelo DENV-3 por 24 h *in vitro*. É importante ressaltar que o requerimento de condições ideais para a não dissolução destas estruturas tenha impedido outros grupos de pesquisa de identificar a presença do MIF nos corpúsculos lipídicos.

É possível que a localização do MIF nos corpúsculos lipídicos possa atuar como uma etapa intermediária na via de secreção desta citocina. Porém, não existem evidências disponíveis que suportem esta hipótese e, portanto, estudos serão necessários para definir a relação funcional entre o MIF e estas organelas. Estudos demonstraram que a secreção do MIF envolve vias não clássicas de secreção, incluindo o transportador ABCA1 (Flieger e cols., 2003) e a proteína associada ao Golgi p115 (Merk e cols., 2009). Assim, seria interessante analisar se estas proteínas, bem como o receptor CD74, colocalizam com o MIF nos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo DENV, bem como se a redução da biogênese destas organelas é capaz de interferir nos mecanismos de secreção do MIF.

Nossos resultados também mostraram que o DENV-3 é capaz de induzir em macrófagos humanos um aumento na secreção de PGE₂ em paralelo ao aumento na formação de corpúsculos lipídicos *in vitro*. De fato, dois estudos observaram o aumento na geração de PGE₂, em diferentes tipos celulares, durante a infecção pelo DENV-2 (Chen e cols., 2001; Liou e cols., 2008). Contudo, nossos dados não são suficientes para afirmar que os corpúsculos lipídicos estejam envolvidos na síntese e secreção de PGE₂ durante a infecção, sendo necessários estudos adicionais que avaliem a localização tanto de enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico – COX e LOX – quanto dos próprios mediadores lipídicos.

Adicionalmente, observamos um aumento na secreção de MIF, TNF- α e IL-6 por macrófagos humanos infectados *in vitro* quando comparados com células incubadas com o mock ou infectadas com o DENV-3 inativado por aquecimento (Assuncao-Miranda e cols., 2010). De maneira importante, o bloqueio do MIF, por anticorpo neutralizante ou antagonista seletivo, levou à inibição tanto da produção de PGE₂ quanto da secreção dos outros mediadores inflamatórios citados sem afetar a replicação viral (Assuncao-Miranda e cols., 2010).

Considerando o envolvimento dos corpúsculos lipídicos na produção de eicosanóides e o papel do MIF na indução da síntese e liberação de PGE₂ (Mitchell e cols., 1999; Leng e cols., 2003; Bozza e cols., 2009), é provável que a localização desta citocina nos corpúsculos lipídicos seja importante para a produção de mediadores lipídicos. Todavia, as possíveis funções intrínsecas do MIF a partir destas organelas ainda precisam ser avaliadas.

O papel do MIF na patogênese da dengue foi investigado e para tal foi utilizado uma cepa de DENV-2 adaptada ao camundongo para um modelo *in vivo* de FHD, caracterizado por aumento na permeabilidade vascular, número e função dos leucócitos alterados, hematócrito elevado, trombocitopenia e hemorragia. Nossos resultados demonstraram que camundongos deficientes de MIF apresentaram um decréscimo na letalidade e redução em todos os parâmetros analisados de gravidade da dengue quando comparados com animais controle, reforçando, portanto, o importante papel desta citocina na patogenia da doença (Assuncao-Miranda e cols., 2010). Entretanto, o papel dos corpúsculos lipídicos e dos diversos mediadores inflamatórios que se encontram elevados durante a infecção *in vivo* pelo DENV ainda precisa ser investigado.

Os nossos resultados e hipóteses estão ilustrados na figura 5.1. Em resumo, observamos que o DENV é capaz de promover a biogênese dos corpúsculos lipídicos de uma maneira dependente das enzimas ácido graxo sintase e acil-CoA sintetase, uma vez que a inibição destas por drogas específicas leva à inibição da formação dos corpúsculos lipídicos. Esta inibição também promove um bloqueio na replicação do DENV, sugerindo um papel destas organelas dinâmicas neste processo. É possível que a proteína C, antes localizada nos corpúsculos lipídicos, possa acumular no citoplasma da célula hospedeira durante a redução da formação destas estruturas e, portanto, interagir prematuramente com o RNA viral, interferindo na amplificação do genoma. Por outro lado, a redução da formação dos corpúsculos lipídicos também pode afetar a montagem do vírus, já que inicialmente durante a infecção, a proteína C possa estar armazenada nestas organelas para em seguida ser mobilizada à membrana do RE, onde a morfogênese da partícula viral tem início. O MIF encontra-se estocado nos corpúsculos lipídicos durante a infecção, porém os mecanismos que

propiciam a sua secreção ainda precisam ser avaliados. Por fim, o DENV é capaz de promover um aumento na geração de PGE_2 , todavia estudos são necessários para analisar se este mediador lipídico é produzido e secretado a partir dos corpúsculos lipídicos induzidos durante a infecção.

Nossas perspectivas visam caracterizar os efeitos da infecção sobre os mecanismos que regulam a biogênese dos corpúsculos lipídicos e sua função na produção e secreção de mediadores inflamatórios, bem como identificar o mecanismo de secreção e/ou funções intrínsecas do MIF a partir destas organelas durante a infecção pelo DENV.

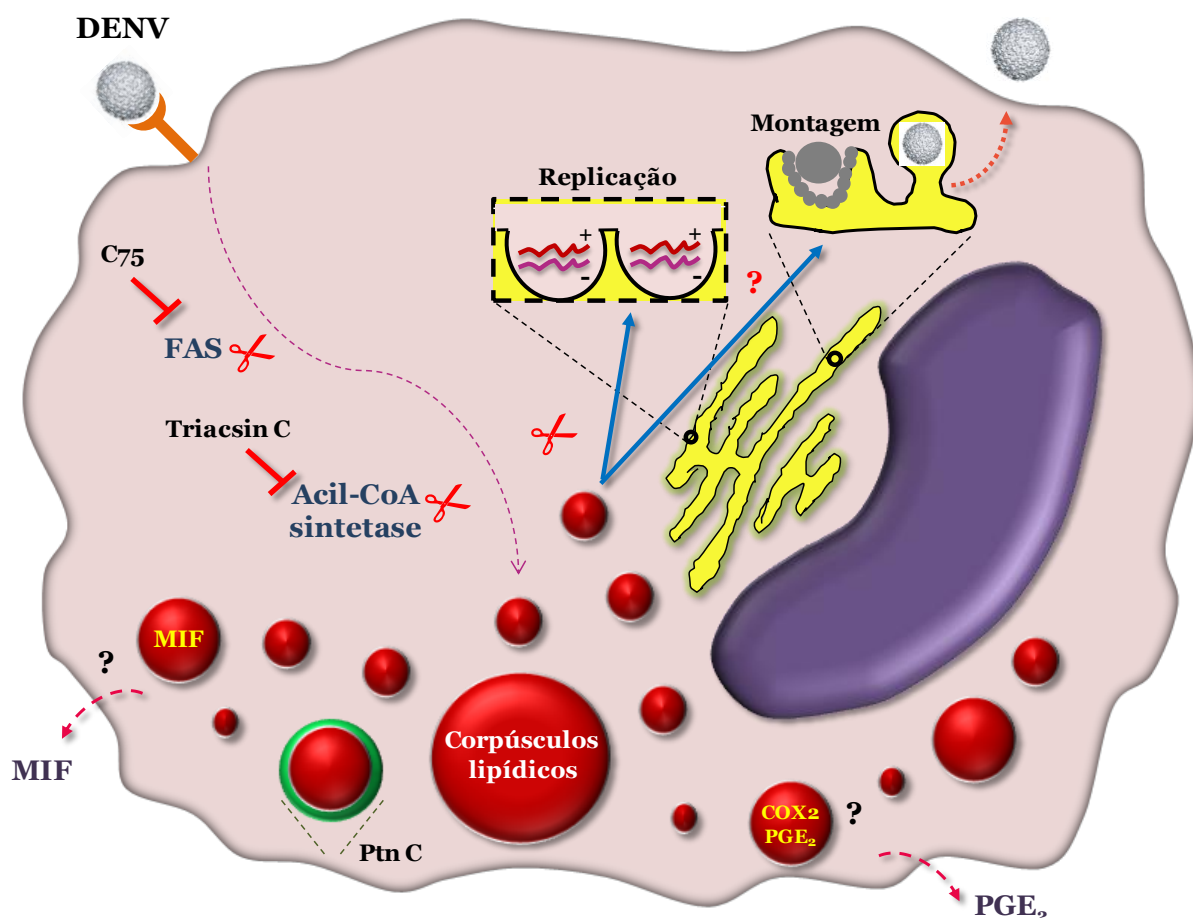


Figura 5.1. Modelo proposto para biogênese e função dos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo vírus dengue. O DENV induz a biogênese dos corpúsculos lipídicos de uma maneira dependente de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, uma vez que a inibição das enzimas ácido graxo sintase e acil-CoA sintetase, por drogas específicas, leva à redução da formação destas organelas dinâmicas. Esta inibição também promove um bloqueio na replicação do DENV, sugerindo um papel dos corpúsculos lipídicos neste processo. Durante a infecção, a proteína C encontra-se localizada nos corpúsculos lipídicos e é possível que a redução da formação destas estruturas promova o acúmulo desta proteína viral no citoplasma da célula hospedeira e, portanto, a mesma pode interagir prematuramente com o RNA viral, interferindo na amplificação do genoma. Por outro lado, a redução da formação dos corpúsculos lipídicos também pode afetar a montagem do vírus, já que inicialmente durante a

infecção, a proteína C possa estar armazenada nestas organelas para em seguida ser mobilizada à membrana do RE, onde a morfogênese da partícula viral tem início. Durante a infecção, o MIF encontra-se estocado nos corpúsculos lipídicos, porém os mecanismos que promovem a sua secreção ainda precisam ser investigados. O DENV é capaz de promover um aumento na geração de PGE₂, entretanto estudos adicionais são necessários para analisar se este mediador lipídico é produzido e secretado a partir dos corpúsculos lipídicos induzidos durante a infecção.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A infecção pelo DENV promove a biogênese de corpúsculos lipídicos tanto em células provenientes de pacientes com FHD quanto em células infectadas *in vitro*.

- ✓ A proteína C do DENV-2 interage especificamente com os corpúsculos lipídicos das células BHK-21, sugerindo que estas organelas possam estar regulando temporariamente o processo viral.

- ✓ Drogas que interferem no metabolismo de lipídios foram capazes de reduzir a formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção *in vitro*, bem como afetar a capacidade replicativa do DENV-2. Estes resultados propõem um papel dos corpúsculos lipídicos na replicação viral.

- ✓ O MIF é estocado nos corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo DENV-3.

- ✓ O aumento na geração de PGE₂ em paralelo ao aumento na formação de corpúsculos lipídicos foi observado durante a infecção pelo DENV-3. Estes dados sugerem que os corpúsculos lipídicos atuem na produção aumentada de mediadores inflamatórios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, e cols. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res* 2008;68(6):1732-40.
- Acioli-Santos B, Segat L, Dhalia R, Brito CA, Braga-Neto UM, Marques ET, e cols. MBL2 gene polymorphisms protect against development of thrombocytopenia associated with severe dengue phenotype. *Hum Immunol* 2008;69(2):122-8.
- Ali M, Wagatsuma Y, Emch M, Breiman RF. Use of a geographic information system for defining spatial risk for dengue transmission in Bangladesh: role for *Aedes albopictus* in an urban outbreak. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(6):634-40.
- Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 2005;339(2):200-12.
- Assuncao-Miranda I, Amaral FA, Bozza FA, Fagundes CT, Sousa LP, Souza DG, e cols. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J* 2010;24(1):218-28.
- 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(1):33-42.
- Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, e cols. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* 2006;193(8):1078-88.
- Bandeira-Melo C, Bozza PT, Weller PF. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol* 2002a;109(3):393-400.
- Bandeira-Melo C, Herbst A, Weller PF. Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001a;24(6):653-7.
- Bandeira-Melo C, Phoofolo M, Weller PF. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem* 2001b;276(25):22779-87.
- Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Phoofolo M, Center DM, Cruikshank WW, e cols. IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. *J Immunol* 2002b;168(9):4756-63.
- Bandeira-Melo C, Weller PF, Bozza PT. EicosaCell - an immunofluorescent-based assay to localize newly synthesized eicosanoid lipid mediators at intracellular sites. *Methods Mol Biol* 2011;689:163-81.

- Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, e cols. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(4):1200-5.
- Bartemes KR, McKinney S, Gleich GJ, Kita H. Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG. *J Immunol* 1999;162(5):2982-9.
- Beil WJ, Weller PF, Peppercorn MA, Galli SJ, Dvorak AM. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF-alpha in colonic Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 1995;58(3):284-98.
- Bente DA, Rico-Hesse R. Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models* 2006;3(1):97-103.
- Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zernecke A, Koenen RR, e cols. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 2007;13(5):587-96.
- Bhoopat L, Bhamarapravati N, Attasiri C, Yoksarn S, Chaiwun B, Khunamornpong S, e cols. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1996;14(2):107-13.
- Boonpucknavig S, Boonpucknavig V, Bhamarapravati N, Nimmannitya S. Immunofluorescence study of skin rash in patients with dengue hemorrhagic fever. *Arch Pathol Lab Med* 1979;103(9):463-6.
- Boulant S, Douglas MW, Moody L, Budkowska A, Targett-Adams P, McLauchlan J. Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* 2008;9(8):1268-82.
- Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratinier M, Targett-Adams P, Lavergne JP, e cols. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 2006;281(31):22236-47.
- Boulant S, Targett-Adams P, McLauchlan J. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol* 2007;88(Pt 8):2204-13.
- Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* 2005;79(17):11353-65.

- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, e cols. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* 2008;8:86.
- Bozza FA, Gomes RN, Japiassu AM, Soares M, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, e cols. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock* 2004;22(4):309-13.
- Bozza PT, Bandeira-Melo C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100 Suppl 1:113-20.
- Bozza PT, Magalhaes KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791(6):540-51.
- Bozza PT, Melo RC, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* 2007;113(1):30-49.
- Bozza PT, Pacheco P, Yu W, Weller PF. NS-398: cyclooxygenase-2 independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;67(4):237-44.
- Bozza PT, Payne JL, Goulet JL, Weller PF. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med* 1996a;183(4):1515-25.
- Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, Weller PF. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996b;93(20):11091-6.
- Bozza PT, Yu W, Cassara J, Weller PF. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J Leukoc Biol* 1998;64(4):563-9.
- Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* 1997;186(6):909-20.
- Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 1997;38(11):2249-63.
- Brass V, Bieck E, Montserret R, Wolk B, Hellings JA, Blum HE, e cols. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 2002;277(10):8130-9.
- Brown DA. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol* 2001;11(11):R446-9.

- Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3(10):791-800.
- Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol* 2007;88(Pt 2):365-75.
- Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;47(2):155-66.
- Chen JS, Greenberg AS, Wang SM. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 2002;86(4):784-91.
- Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, e cols. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74(1):142-7.
- Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Wang L, Chang JC, Yu HR, e cols. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;44(1):43-50.
- Chen RF, Yeh WT, Yang MY, Yang KD. A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;30(1):1-7.
- Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, e cols. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 2008;453(7195):672-6.
- 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(4):2650-7.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 2006;80(23):11418-31.
- Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 2003;77(7):3929-38.
- Conceicao TM, Da Poian AT, Sorgine MH. A real-time PCR procedure for detection of dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and their quantitation in clinical and laboratory samples. *J Virol Methods* 2010;163(1):1-9.
- Conceicao TM, El-Bacha T, Villas-Boas CS, Coello G, Ramirez J, Montero-Lomeli M, e cols. Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response. *J Infect* 2009;60(1):65-75.

- D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol* 2008;8(10):1308-15.
- D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* 2006;176(5):3087-97.
- de Araujo JM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, e cols. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods* 2009;155(1):34-8.
- de Assis EF, Silva AR, Caiado LF, Marathe GK, Zimmerman GA, Prescott SM, e cols. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol* 2003;171(4):2090-8.
- de la CSB, Kouri G, Guzman MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol* 2007;152(3):533-42.
- Dvorak AM, Morgan ES, Weller PF. Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor to lipid bodies and secretory granules in human mast cells. *Histochem J* 2001;33(7):397-402.
- Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe* 2009;5(4):318-28.
- Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect* 2000;2(13):1643-9.
- Fink J, Gu F, Vasudevan SG. Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol* 2006;16(4):263-75.
- Flieger O, Engling A, Bucala R, Lue H, Nickel W, Bernhagen J. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett* 2003;551(1-3):78-86.
- Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M, e cols. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(1):47-59.
- Fujimoto Y, Onoduka J, Homma KJ, Yamaguchi S, Mori M, Higashi Y, e cols. Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase. *Biol Pharm Bull* 2006;29(11):2174-80.
- Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *BMJ* 2002;324(7353):1563-6.

- Gomes AL, Wee LJ, Khan AM, Gil LH, Marques ET, Jr., Calzavara-Silva CE, e cols. Classification of dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines. *PLoS One* 2010;5(6):e11267.
- Goncalvez AP, Engle RE, St Claire M, Purcell RH, Lai CJ. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(22):9422-7.
- Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 2008;371(9611):500-9.
- Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19(5):429-36.
- Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, e cols. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol* 1999;59(3):329-34.
- Grief C, Galler R, Cortes LM, Barth OM. Intracellular localisation of dengue-2 RNA in mosquito cell culture using electron microscopic in situ hybridisation. *Arch Virol* 1997;142(12):2347-57.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998a;11(3):480-96.
- Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 2002a;10(2):100-3.
- Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 2002b;33(4):330-42.
- Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1998b;4(3):442-50.
- Guzman MG. Global voices of science. Deciphering dengue: the Cuban experience. *Science* 2005;309(5740):1495-7.
- Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102(6):522-3.
- Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2002;2(1):33-42.
- Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis* 2002;6(2):118-24.
- Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007;370(9599):1644-52.
- Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* 2008;53:273-91.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988;239(4839):476-81.

- Halstead SB, Lan NT, Myint TT, Shwe TN, Nisalak A, Kalyanarooj S, e cols. Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. *Emerg Infect Dis* 2002;8(12):1474-9.
- Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 1977;146(1):201-17.
- Heaton NS, Perera R, Berger KL, Khadka S, Lacount DJ, Kuhn RJ, e cols. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(40):17345-50.
- Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 1998;294(2):309-21.
- Heinz FX, Allison SL. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol* 2001;4(4):450-5.
- Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 1990;3(4):376-96.
- Higa LM, Caruso MB, Canellas F, Soares MR, Oliveira-Carvalho AL, Chapeaurouge DA, e cols. Secretome of HepG2 cells infected with dengue virus: implications for pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784(11):1607-16.
- Hope RG, McLauchlan J. Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 8):1913-25.
- Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 2000;39(1):41-82.
- Ivanyi-Nagy R, Darlix JL. Intrinsic disorder in the core proteins of flaviviruses. *Protein Pept Lett* 2010;17(8):1019-25.
- Iyngkaran N, Yadav M, Sinniah M. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. *Singapore Med J* 1995;36(2):218-21.
- Jindadamrongwech S, Theparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 2004;149(5):915-27.
- Johnson MM, Vaughn B, Triggiani M, Swan DD, Fonteh AN, Chilton FH. Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21(2):253-8.
- Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol* 2003;77(12):7143-9.

- Junjhon J, Lausumpao M, Supasa S, Noisakran S, Songjaeng A, Saraithong P, e cols. Differential modulation of prM cleavage, extracellular particle distribution, and virus infectivity by conserved residues at nonfurin consensus positions of the dengue virus pr-M junction. *J Virol* 2008;82(21):10776-91.
- Kim K, Kim KH, Ha E, Park JY, Sakamoto N, Cheong J. Hepatitis C virus NS5A protein increases hepatic lipid accumulation via induction of activation and expression of PPARgamma. *FEBS Lett* 2009;583(17):2720-6.
- Kim KH, Hong SP, Kim K, Park MJ, Kim KJ, Cheong J. HCV core protein induces hepatic lipid accumulation by activating SREBP1 and PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355(4):883-8.
- Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40(4):444-51.
- Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* 1989;67(4):375-80.
- Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007;30(5-6):329-40.
- Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* 2008;62:71-92.
- Lee CJ, Lin HR, Liao CL, Lin YL. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J Virol* 2008;82(13):6470-80.
- Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, e cols. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol* 2006;87(Pt 12):3623-30.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, e cols. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999;73(6):4738-47.
- Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, e cols. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003;197(11):1467-76.
- Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, e cols. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2002;186(8):1165-8.

- Lim KG, Wan HC, Bozza PT, Resnick MB, Wong DT, Cruikshank WW, e cols. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J Immunol* 1996;156(7):2566-70.
- Lima-Cabello E, Garcia-Mediavilla MV, Miquilena-Colina ME, Vargas-Castrillon J, Lozano-Rodriguez T, Fernandez-Bermejo M, e cols. Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *Clin Sci (Lond)* 2010;120(6):239-50.
- Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, e cols. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol* 2005;174(1):395-403.
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (Eds.). 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. *Fields virology*, p. 1101-1152; 2007.
- Liou JT, Chen ZY, Ho LJ, Yang SP, Chang DM, Liang CC, e cols. Differential effects of triptolide and tetrandrine on activation of COX-2, NF-kappaB, and AP-1 and virus production in dengue virus-infected human lung cells. *Eur J Pharmacol* 2008;589(1-3):288-98.
- Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RG. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* 2004;279(5):3787-92.
- Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10(1):51-8.
- Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie* 2005;87(1):45-9.
- Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, e cols. 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(25):23698-708.
- Lyn RK, Kennedy DC, Stolor A, Ridsdale A, Pezacki JP. Dynamics of lipid droplets induced by the hepatitis C virus core protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;399(4):518-24.
- Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(10):3414-9.

- Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 1996;220(1):232-40.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 2004;10(12 Suppl):S98-109.
- Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, e cols. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis* 2002;185(12):1697-703.
- Markoff L, Falgout B, Chang A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. *Virology* 1997;233(1):105-17.
- Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, e cols. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* 2008;82(16):7964-76.
- Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev* 2008;225:300-13.
- Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H, e cols. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2008;283(4):2203-10.
- McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2000;2(9):1041-50.
- McLauchlan J. Hepatitis C virus: viral proteins on the move. *Biochem Soc Trans* 2009a;37(Pt 5):986-90.
- McLauchlan J. Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochim Biophys Acta* 2009b;1791(6):552-9.
- McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 2002;21(15):3980-8.
- Melo MN, Sousa FJ, Carneiro FA, Castanho MA, Valente AP, Almeida FC, e cols. Interaction of the Dengue virus fusion peptide with membranes assessed by NMR: The essential role of the envelope protein Trp101 for membrane fusion. *J Mol Biol* 2009;392(3):736-46.

- Melo RC, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* 2003;35(1):59-67.
- Merk M, Baugh J, Zierow S, Leng L, Pal U, Lee SJ, e cols. The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* 2009;182(11):6896-906.
- 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(7):800-9.
- Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, e cols. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol* 1997;16(4):204-8.
- Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, e cols. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog* 2008;4(2):e17.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue. Análise de situação e tendências - 2010. MS/SVS, 2010. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se_26_final_11_8_10.pdf>. Acesso em 20/11/2010.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica. Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil. Brasília: MS/SVS, 2010. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_denv_4_24_09_2010_eh.pdf>. Acesso em 20/11/2010.
- Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* 1999;274(25):18100-6.
- Miura S, Gan JW, Brzostowski J, Parisi MJ, Schultz CJ, Londos C, e cols. Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 2002;277(35):32253-7.
- Miyazawa Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, e cols. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007;9(9):1089-97.
- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, e cols. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2003;9(7):921-7.

- Moradpour D, Englert C, Wakita T, Wands JR. Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996;222(1):51-63.
- Moreira LS, Piva B, Gentile LB, Mesquita-Santos FP, D'Avila H, Maya-Monteiro CM, e cols. Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791(3):156-65.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(1):13-22.
- Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 2001;40(5):325-438.
- Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;30(3):229-33.
- Nascimento EJ, Silva AM, Cordeiro MT, Brito CA, Gil LH, Braga-Neto U, e cols. Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. *PLoS One* 2009;4(8):e6782.
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, e cols. 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(7):723-8.
- Negro F. Hepatitis C virus and liver steatosis: when fat is not beautiful. *J Hepatol* 2004;40(3):533-5.
- Negro F, Sanyal AJ. Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data. *Liver Int* 2009;29 Suppl 2:26-37.
- Ng CY, Gu F, Phong WY, Chen YL, Lim SP, Davidson A, e cols. Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing. *Antiviral Res* 2007;76(3):222-31.
- Nishioka K. Serum complement level in dengue hemorrhagic fever. *Allerg Immunol (Leipz)* 1974;20-21(4):385-92.
- Noble CG, Chen YL, Dong H, Gu F, Lim SP, Schul W, e cols. Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antiviral Res* 2010;85(3):450-62.
- Nogueira RM, de Araujo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica* 2007;22(5):358-63.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(7):925-6.

- Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, e cols. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 2005;11(9):1376-81.
- Nogueira RM, Zagner SM, Martins IS, Lampe E, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86(2):269.
- Noisakran S, Perng GC. Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 233(4):401-8.
- Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, e cols. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 2002;169(11):6498-506.
- Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, e cols. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol* 2007;179(12):8500-8.
- Pacsa AS, Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;28(2):151-5.
- Paes MV, Lenzi HL, Nogueira AC, Nuovo GJ, Pinhao AT, Mota EM, e cols. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest* 2009;89(10):1140-51.
- Paes MV, Pinhao AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, Nogueira AC, e cols. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology* 2005;338(2):236-46.
- Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 2007;85(1):43-5.
- Pengsaa K, Luxemburger C, Sabchareon A, Limkittikul K, Yoksan S, Chambonneau L, e cols. Dengue virus infections in the first 2 years of life and the kinetics of transplacentally transferred dengue neutralizing antibodies in thai children. *J Infect Dis* 2006;194(11):1570-6.
- Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* 2008;11(4):369-77.

- Phoolcharoen W, Smith DR. Internalization of the dengue virus is cell cycle modulated in HepG2, but not Vero cells. *J Med Virol* 2004;74(3):434-41.
- Preeyasombat C, Treepongkaruna S, Sriphrapradang A, Choubtum L. The role of prostacyclin (PGI₂) and thromboxane A₂ (TXA₂) in pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF). *J Med Assoc Thai* 1999;82 Suppl 1:S16-21.
- Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, Wright PJ. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65(5):427-34.
- Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, e cols. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 1998;56(3):280-5.
- Rico-Hesse R. Dengue virus markers of virulence and pathogenicity. *Future Virol* 2009;4(6):581.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, e cols. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997;230(2):244-51.
- Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998;352(9132):971-7.
- Robenek H, Buers I, Hofnagel O, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ. Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791(6):408-18.
- Rothwell C, Lebreton A, Young Ng C, Lim JY, Liu W, Vasudevan S, e cols. Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication. *Virology* 2009;389(1-2):8-19.
- Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assuncao-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, e cols. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* 2009;5(10):e1000632.
- Sangiambut S, Keelapang P, Aaskov J, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, e cols. Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. *J Gen Virol* 2008;89(Pt 5):1254-64.
- Schatzmayer HG. [Emerging and reemerging viral diseases]. *Cad Saude Publica* 2001;17 Suppl:209-13.
- Schatzmayer HG, Cabral MC. *A virologia no estado do Rio de Janeiro: uma visão global*. 1^a ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2009.
- Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100(7):608-14.

- Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, Bartenschlager R. The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 2007;282(51):37158-69.
- Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM. Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002;292(2):198-210.
- Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, e cols. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 2006;25(4):595-606.
- Sierra B, Alegre R, Perez AB, Garcia G, Sturn-Ramirez K, Obasanjo O, e cols. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol* 2007;68(6):531-40.
- Silva AR, de Assis EF, Caiado LF, Marathe GK, Bozza MT, McIntyre TM, e cols. Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein. *J Immunol* 2002;168(8):4112-20.
- Simmons CP, Chau TN, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Thien NT, e cols. Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. *J Infect Dis* 2007;196(3):416-24.
- Solomon T, Mallewa M. Dengue and other emerging flaviviruses. *J Infect* 2001;42(2):104-15.
- Souza DG, Fagundes CT, Sousa LP, Amaral FA, Souza RS, Souza AL, e cols. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(33):14138-43.
- Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003;40(6):643-72.
- Suksanpaisan L, Susantad T, Smith DR. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *J Biomed Sci* 2009;16:17.
- Syed GH, Amako Y, Siddiqui A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2009;21(1):33-40.
- Targett-Adams P, Boulant S, McLauchlan J. Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2008a;82(5):2182-95.

- Targett-Adams P, Hope G, Boulant S, McLauchlan J. Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem* 2008b;283(24):16850-9.
- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, e cols. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 2003;197(7):823-9.
- Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* 2002;277(46):44507-12.
- Teixeira Mda G, Costa Mda C, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saude Publica* 2005;21(5):1307-15.
- Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica* 2009;25 Suppl 1:S7-18.
- Thiele C, Spandl J. Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20(4):378-85.
- Umlauf E, Csaszar E, Moertelmaier M, Schuetz GJ, Parton RG, Prohaska R. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem* 2004;279(22):23699-709.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, e cols. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000;181(1):2-9.
- Vieira-de-Abreu A, Assis EF, Gomes GS, Castro-Faria-Neto HC, Weller PF, Bandeira-Melo C, e cols. Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C4 synthesis within eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33(3):254-61.
- Vieira-de-Abreu A, Calheiros AS, Mesquita-Santos FP, Magalhaes ES, Mourao-Sa D, Castro-Faria-Neto HC, e cols. Crosstalk between MIF and Eotaxin in Allergic Eosinophil Activation Forms LTC4-Synthesizing Lipid Bodies. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Apr;44(4):509-16.
- Wan HC, Melo RC, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J* 2007;21(1):167-78.
- Wang SH, Syu WJ, Hu ST. Identification of the homotypic interaction domain of the core protein of dengue virus type 2. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 8):2307-14.
- Wang SH, Syu WJ, Huang KJ, Lei HY, Yao CW, King CC, e cols. Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 12):3093-102.

- Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, e cols. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology* 2003;305(2):330-8.
- Wang WK, Chen HL, Yang CF, Hsieh SC, Juan CC, Chang SM, e cols. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 2006;43(8):1023-30.
- Waris G, Felmlee DJ, Negro F, Siddiqui A. Hepatitis C virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress. *J Virol* 2007;81(15):8122-30.
- Watanaveeradej V, Endy TP, Samakoses R, Kerdpanich A, Simasathien S, Polprasert N, e cols. Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(2):123-8.
- Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* 2009;9(4):523-40.
- Weller PF, Ackerman SJ, Nicholson-Weller A, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol* 1989;135(5):947-59.
- Weller PF, Bozza PT, Yu W, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118(2-4):450-2.
- Weller PF, Ryeom SW, Picard ST, Ackerman SJ, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol* 1991;113(1):137-46.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, e cols. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 2009;5(4):365-75.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(7):518-28.
- WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet N° 117. World Health Organization;2009.
Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>>. Acesso em 20/11/2010.
- WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1997.
- WHO. International travel and health. Disease distribution maps. World Health Organization; 2010. Disponível em <<http://www.who.int/ith/en/>>. Acesso em 20/11/2010.

- Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am* 2008;92(6):1377-90, x.
- Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett* 2006;580(23):5484-91.
- Wooten RE, Willingham MC, Daniel LW, Leslie CC, Rogers LC, Sergeant S, e cols. Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2alpha fluorescent proteins. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783(8):1544-50.
- Yang KD, Lee CS, Shaio MF. A higher production of platelet activating factor in ex vivo heterologously secondary dengue-2 virus infections. *Acta Microbiol Immunol Hung* 1995;42(4):403-7.
- Yang W, Hood BL, Chadwick SL, Liu S, Watkins SC, Luo G, e cols. Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology* 2008;48(5):1396-403.
- Yauch LE, Shresta S. Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res* 2008;80(2):87-93.
- Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, e cols. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol* 1998;152(3):759-69.
- Yu W, Cassara J, Weller PF. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood* 2000;95(3):1078-85.
- Zhu W, Qin C, Chen S, Jiang T, Yu M, Yu X, e cols. Attenuated dengue 2 viruses with deletions in capsid protein derived from an infectious full-length cDNA clone. *Virus Res* 2007;126(1-2):226-32.
- Zweytick D, Athenstaedt K, Daum G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 2000;1469(2):101-20.

8. ANEXOS

Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation

Marcelo M. Samsa¹, Juan A. Mondotte¹, Nestor G. Iglesias¹, Iranaia Assunção-Miranda², Giselle Barbosa-Lima³, Andrea T. Da Poian², Patricia T. Bozza³, Andrea V. Gamarnik^{1*}

1 Fundación Instituto Leloir-CONICET, Buenos Aires, Argentina, **2** Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratório de Imunofarmacologia, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Dengue virus is responsible for the highest rates of disease and mortality among the members of the *Flavivirus* genus. Dengue epidemics are still occurring around the world, indicating an urgent need of prophylactic vaccines and antivirals. In recent years, a great deal has been learned about the mechanisms of dengue virus genome amplification. However, little is known about the process by which the capsid protein recruits the viral genome during encapsidation. Here, we found that the mature capsid protein in the cytoplasm of dengue virus infected cells accumulates on the surface of ER-derived organelles named lipid droplets. Mutagenesis analysis using infectious dengue virus clones has identified specific hydrophobic amino acids, located in the center of the capsid protein, as key elements for lipid droplet association. Substitutions of amino acid L50 or L54 in the capsid protein disrupted lipid droplet targeting and impaired viral particle formation. We also report that dengue virus infection increases the number of lipid droplets per cell, suggesting a link between lipid droplet metabolism and viral replication. In this regard, we found that pharmacological manipulation of the amount of lipid droplets in the cell can be a means to control dengue virus replication. In addition, we developed a novel genetic system to dissociate cis-acting RNA replication elements from the capsid coding sequence. Using this system, we found that mislocalization of a mutated capsid protein decreased viral RNA amplification. We propose that lipid droplets play multiple roles during the viral life cycle; they could sequester the viral capsid protein early during infection and provide a scaffold for genome encapsidation.

Citation: Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, et al. (2009) Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoS Pathog* 5(10): e1000632. doi:10.1371/journal.ppat.1000632

Editor: Michael S. Diamond, Washington University School of Medicine, United States of America

Received: May 5, 2009; **Accepted:** September 25, 2009; **Published:** October 23, 2009

Copyright: © 2009 Samsa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by Howard Hughes Medical Institute (International Program in Infectious Diseases (<http://hhminews.org/research/scholars/gamarnik.html>)). ATDP was supported by the INCT-Dengue. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: agamarnik@leloir.org.ar

Introduction

The genus *Flavivirus* comprises a large group of emerging and re-emerging pathogens capable of causing severe human diseases. It includes yellow fever (YFV), dengue (DENV), West Nile (WNV), tick borne encephalitis (TBEV), and Japanese encephalitis (JEV) viruses. DENV is the most significant mosquito borne human viral pathogen worldwide. It infects more than 50 million people each year, resulting in around 25,000 deaths. The lack of vaccines and antivirals against DENV leaves the 2 billion people at risk, mainly in poor countries, in a constant state of alarm [1].

The replication cycle of different members of the *Flavivirus* genus is fundamentally similar. The viral genome is a single plus-stranded RNA molecule that serves as messenger for viral protein synthesis, template for RNA amplification, and substrate for encapsidation [2]. In recent years, a number of cis-acting RNA elements have been identified in the coding and uncoding regions of the flavivirus genomes as promoters, enhancers, and cyclization signals necessary for efficient amplification of the viral RNA (for review see [3]). A mechanism by which the viral polymerase specifically recognizes and copies the viral genome has been recently proposed [4]. In contrast, little is known about the

recognition of the viral RNA by the capsid (C) protein. For flaviviruses, it is still unclear how, when, and where the C protein recruits the viral RNA during viral particle morphogenesis. In this work, we used DENV to investigate how the C protein usurps cellular organelles to facilitate viral replication.

The flavivirus genomes contain a long ORF encoding a polyprotein that is cleaved into three structural proteins (C, prM, and E) and seven nonstructural proteins (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) [5]. The proteins C and prM are connected by an internal hydrophobic signal sequence that spans the ER membrane and is responsible for the translocation of prM into the ER lumen. The first cleavage is accomplished by the viral NS3/2B protease, which resides in the cytoplasmic side of the ER membrane and separates the mature C protein from its membrane anchor sequence [6–8]. It has been proposed that the mature form of the C protein remains associated to intracellular membranes via an internal hydrophobic region conserved in all flaviviruses [9].

In flavivirus infected cells, the C protein was detected both in the cytoplasm and the nucleus [10–13]. Inside the nucleus it has been shown to accumulate in the nucleolus. The cytoplasmic fraction of the C protein of kunjin virus (KUNV) was found near structures called convoluted membranes in close association with

Author Summary

Dengue virus is the single most significant arthropod-borne virus pathogen in humans. In spite of the urgent medical need to control dengue infections, vaccines are still unavailable, and many aspects of dengue virus biology and pathogenesis remain elusive. We discovered a link between dengue virus replication and ER-derived organelles known as lipid droplets (LDs). Dengue infection increases the amount of LDs per cell and pharmacological inhibition of LD formation greatly reduces dengue virus replication. In addition, we have found that the viral capsid protein in infected cells accumulates on the surface of LDs. Manipulation of infectious clones and generation of new reporter dengue viruses allowed us to define the molecular basis of capsid protein association to LDs. Specific amino acids on the $\alpha 2$ helix, located in the center of the capsid protein, were found to be crucial for both accumulation of capsid protein on LDs and dengue virus infectious particle formation. We propose that LDs facilitate viral replication providing a platform for nucleocapsid formation during encapsidation. Our findings begin to unravel the complex mechanism by which dengue virus usurps cellular organelles to coordinate different steps of the viral life cycle.

vesicle packets, which are the sites of RNA replication [11,14,15]. A recent report has demonstrated a complex membrane architecture that links flavivirus genome replication and viral assembly [16]. A coupling between RNA synthesis and RNA encapsidation has been also suggested [17]. It was shown that viral RNAs were not encapsidated if they were not actively synthesized in the replication complexes. Interestingly, a complex connection between the encapsidation process and proteins of the RNA replication machinery is emerging. Specific amino acid changes in NS2A and NS3 were found to impair particle formation [18–21]. Whether these NS proteins bind to the C protein, to the viral RNA, or to cellular components (proteins or membranes) is still unknown.

The mature C is a highly basic protein of 12 kDa that forms homodimers in solution [22,23]. The first 32 and the last 26 residues of the KUNV C protein were proposed to interact with the viral RNA [24]. The tridimensional structures of DENV and WNV C proteins were recently solved by NMR and crystallography, respectively [25,26]. These studies indicated that the monomer contains four alpha helices ($\alpha 1$ to $\alpha 4$). The first 20 amino acids are unstructured in solution and were cleaved in the WNV C crystals [26]. The first 3 helices ($\alpha 1$ to $\alpha 3$) form a right handed bundle that comprises the monomer core. The different orientation of $\alpha 1$ in WNV and DENV suggested that this helix is flexible. The $\alpha 4$, the longest helix, extends away from the monomer core and has a high density of basic residues on the solvent accessible surface, which were proposed to interact with the viral RNA. On the opposite side of the molecule, the surface contributed by $\alpha 2$ – $\alpha 2'$ and $\alpha 1$ – $\alpha 1'$ is largely uncharged and is proposed to interact with membranes [25]. The originally described internal hydrophobic region, residues 46 to 66 in DENV C, includes helices $\alpha 2$ and $\alpha 3$ [9]. Although the C protein is the least conserved of the flavivirus proteins, the structural properties are very similar and the charge distribution is well conserved.

Here, we investigated the subcellular localization of the C protein in DENV infected cells and found that the cytoplasmic C accumulates around ER-derived organelles called lipid droplets

(LDs). A novel reporter system was developed, which allowed us to dissociate cis-acting signals for RNA synthesis from the C coding sequence. Using infectious DENV RNAs and the new reporter system, specific residues in the $\alpha 2$ helix of the C protein were identified as crucial determinants for LD localization and DENV particle formation. Furthermore, we report that pharmacological inhibition of LD formation greatly decreases DENV replication, providing new ideas for antiviral strategies.

Results

Lipid droplet localization of DENV C protein in infected cells

Localization of the C protein in the cytoplasm and the nucleus of DENV infected cells has been previously reported. The nuclear localization was carefully analyzed by several groups [12,13]. In contrast, there is limited information regarding the distribution of the C protein in the cytoplasm of the infected cell, which is the place of viral encapsidation. To investigate the subcellular localization of the C protein during viral replication, DENV2 was used to infect BHK cells. As previously described, when cells were fixed with methanol and used for indirect immunofluorescence, the C protein was found in the nucleus and accumulated in the nucleolus (Fig. 1A, left panel). Methanol fixation is known to extract cellular lipids. Therefore, in order to preserve the membranous structures induced by viral infection, and to investigate the distribution of C in the cytoplasm, DENV infected cells were fixed with paraformaldehyde and permeabilized with a low concentration of Triton X-100. Remarkably, in these conditions, all the infected cells showed C protein accumulation in defined spherical structures (Fig. 1A, right panel). Higher magnification of the images using confocal microscopy revealed that the C protein was organized in a ring-like pattern (Fig. 1A). Co-localization of DENV C with ER or Golgi markers was not observed in these conditions (data not shown). The images of C labeling after DENV infection resembled the distribution of the core protein reported for hepatitis C (HCV), which accumulates on the surface of lipid droplets (LDs) [27–29]. To analyze whether DENV C associates to these organelles, infected cells were labeled with antibodies against C and incubated with BODIPY, which stains neutral lipids in LDs. These studies revealed that most of the C protein observed was present around LDs (Fig. 1B). Localization of the C protein surrounding LDs was observed in different DENV infected human cells such as HepG2 and HeLa (Fig. 1B and data not shown). In addition, because DENV is a mosquito borne virus, we examined the localization of C in infected mosquito C6/36 cells. The cytoplasmic localization of C in these cells was also surrounding LDs (Fig. 1B).

To further study the association of C with LDs, sucrose gradients were used to separate the LD fraction by flotation. The presence of C and the adipose differentiation-related protein (ADRP or adipophilin, LD marker) were detected by western blots. A fraction of C was detected together with ADRP in LDs (Fig. 1C). In this fraction the lactate dehydrogenase activity was not detected, indicating lack of cytosolic contamination. The amount of C observed in the LD fraction was lower than that expected according to the co-localization observed with BODIPY (Fig. 1C). It is possible that the viral protein partially dissociates during cell disruption and biochemical fractionation. In order to further analyze the localization of C in the cytoplasm of DENV infected cells, co-localization of C with ADRP was also determined. These studies showed the presence of C and ADRP on LDs (Fig. 1D). Early after infection, we observed single LDs

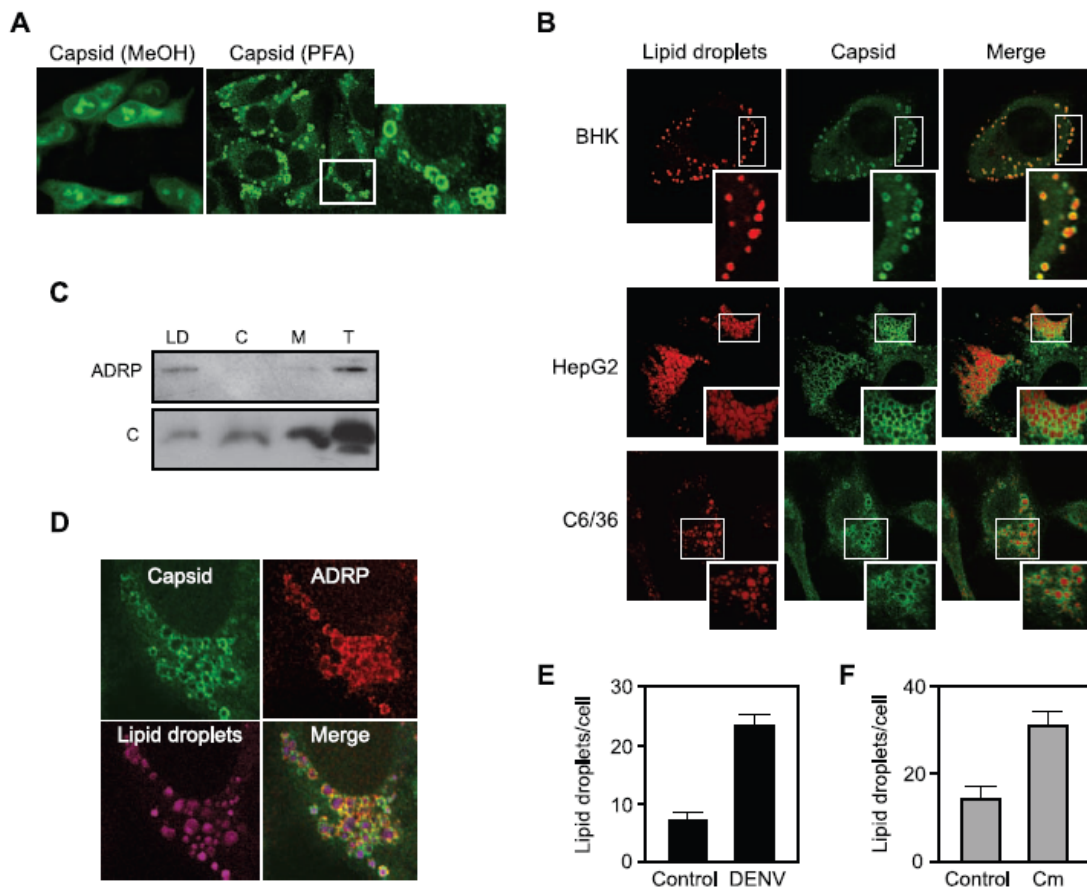


Figure 1. DENV infected cells accumulate the C protein around lipid droplets. **A.** Nuclear and cytoplasmic distribution of C protein in DENV infected BHK cells. Cells were infected with DENV2 and analyzed by immunofluorescence using a polyclonal anti-C antibody. Cells were fixed with methanol (MeOH) or paraformaldehyde (PFA) as indicated on the top. **B.** The C protein is targeted to lipid droplets. BHK, HepG2, and C6/36 cells were infected with DENV2, fixed at 48 h post-infection, probed with anti-C antibodies and BODIPY for lipid droplets staining, and examined by confocal microscopy. **C.** Subcellular fractionation of LDs. DENV-infected cell lysates were fractionated into lipid droplets (LD), cytosol (C), and microsome (M) fractions by sucrose gradient centrifugation. A total cytoplasmic extract was also included (T). The samples were immunoblotted with anti-ADRP and anti-C antibodies. **D.** Co-localization of C and ADRP on LDs. DENV infected BHK cells were analyzed by immunofluorescence with anti-ADRP and anti-C antibodies, and stained with BODIPY. **E.** DENV infection increases the number of lipid droplets. The amount of lipid droplets in control or DENV infected BHK cells were determined. Cells were fixed 48 h post-infection, incubated in 1.5% of OsO₄, and lipid bodies were enumerated by light microscopy in 50 consecutive cells in each slide in triplicates. The bars indicate the standard error of the mean (+/-SEM), ($P < 0.0002$). **F.** Expression of C protein increases the number of lipid droplets. The amount of lipid droplets in control or C expressing BHK cells were determined as described above. The bars represent the standard error of the mean ($P < 0.0001$). doi:10.1371/journal.ppat.1000632.g001

carrying both proteins, C and ADRP. In addition, droplets containing either C or ADRP were also observed.

LDs are ER-derived organelles that contain a core of neutral lipids enclosed by a monolayer of phospholipids and exhibit variable protein content [30]. The metabolism of LDs has attracted considerable attention due to its link with human diseases such as obesity, inflammation, and cancer [31,32]. LDs are found in different cell types in normal conditions. However, it was noticeable that DENV infection increased the size and the amount of LDs per cell. Quantitative analysis showed a 3-fold increase in the amount of LDs in DENV infected cells as compared with mock infected cells (Fig. 1E). To investigate whether C was the viral factor responsible for the increase in the number of LDs, droplets were enumerated in cells expressing only

the C protein. BHK cells were transfected with an expression vector encoding the mature form of C or a control vector. The level of expression of the C protein was slightly higher than that observed in DENV infected cells. Enumeration of droplets indicated that the viral protein increased about 2-fold the amount of LDs per cell (Fig. 1F). The higher increase of LDs observed after DENV infection in respect to that observed in cells expressing only C could be due to the different source of the protein when it is produced from the viral polyprotein. In addition, it is possible that other viral factors or the infection itself affects LD metabolism. Thus, we evaluated the amount of LDs in DENV replicon-expressing BHK cells. In this case, the amount of LDs was not significantly different to that observed in replicon-cured cells (data not shown).

The accumulation of the viral C protein around LDs and the increased number of droplets observed in DENV-infected cells provide the first link between these organelles and DENV replication.

The mature C protein is targeted to LD in the absence of other viral proteins

During flavivirus polyprotein synthesis, the C protein is targeted to the ER membrane by the anchor peptide, which is removed by the viral NS3/2B protease in the cytoplasm and the host signal

peptidase in the ER lumen (Fig. 2A, left panel). To investigate whether the anchor peptide plays a role in targeting the C protein to LDs, a full-length genomic DENV cDNA was modified to include an artificial FMDV2A cleavage site at the C-terminus of the C protein (DENV-FMDV2A), which would release co-translationally the mature C protein. Transfection of DENV-WT or DENV-FMDV2A RNAs into BHK cells resulted in efficient translation and amplification of viral RNAs (data not shown). Appropriate cleavage of C by the FMDV 2A was demonstrated by Western blot analysis of cytoplasmic extracts

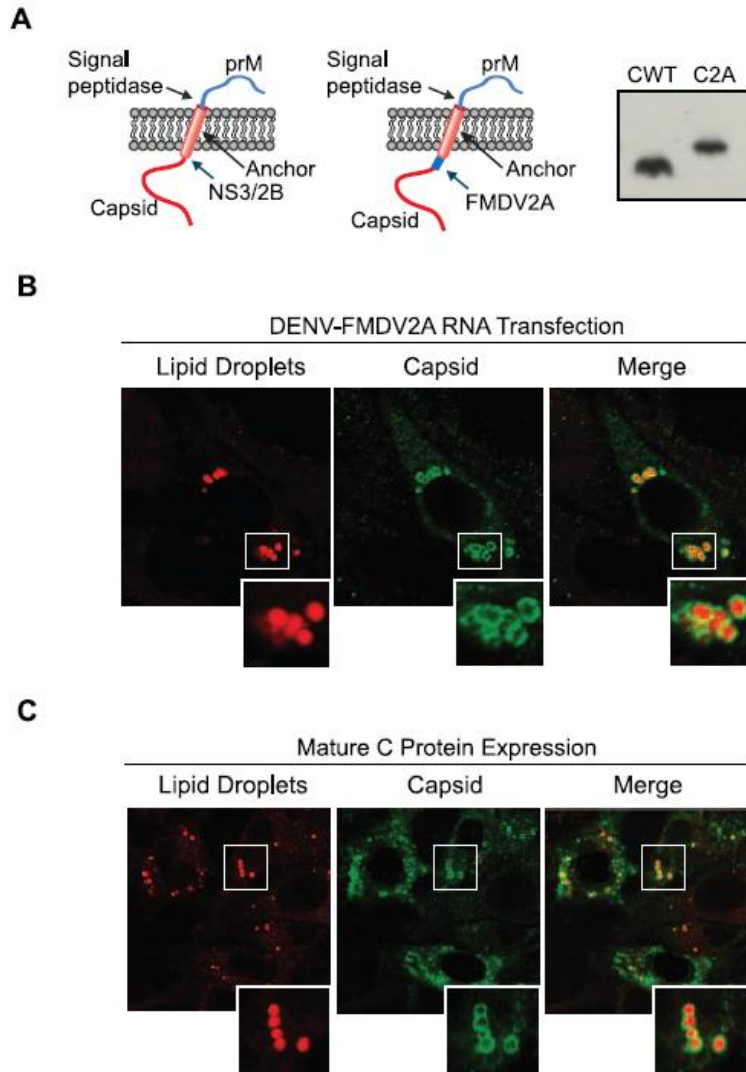


Figure 2. The C protein contains the structural determinants for LD targeting. **A.** Schematic representation of the topology of the viral C and prM proteins on the ER membrane. The anchor peptide and the cleavage sites of the signal peptidase and viral NS3/2B proteases are indicated. The location of the FMDV2A protease replacing the NS3/2B site is shown in the scheme on the right. The western blot shows expression of the C protein in cytoplasmic extracts of cells transfected with a full length DENV RNA WT (Cwt) or the RNA including the FMDV2A site (C2A). **B.** The anchor peptide is dispensable for C accumulation on LDs. BHK cells transfected with the DENV-FMDV2A RNA were fixed and probed with antibodies against C and BODIPY to stain neutral lipids in LDs, as indicated on the top. **C.** Expression of the mature C protein in the absence of other viral components is sufficient for LD targeting. BHK cells were transfected with an expression plasmid that encode the mature form of DENV C protein. Twenty four h post-transfection cells were fixed and probed with anti-C antibodies followed by staining of lipid droplet.
doi:10.1371/journal.ppat.1000632.g002

obtained at 24 and 48 h post-transfection using anti-C antibodies (Fig. 2A, right panel). As expected, DENV-FMDV2A RNA produced a C protein about 2 kDa larger than the WT protein, corresponding to C plus 19 amino acids of the FMDV2A (Fig. 2A, C2A). Confocal microscopy analysis indicated that the prematurely processed C protein localized almost exclusively around LDs, indicating that the anchor peptide that targets the C protein to ER membranes during polyprotein synthesis is not required for protein C localization on LDs (Fig. 2B).

To determine whether C association to LDs requires other viral components, the mature C protein was expressed using a plasmid under control of the CMV promoter in BHK cells. Cells were analyzed by immunofluorescence using anti-C antibodies and stained with BODIPY at 10, 24 and 48 h post-transfection. Although the level of mature C protein expressed in BHK cells was higher than that observed after DENV infection, most of the expressed C protein also accumulated around LDs (Fig. 2C). This analysis indicates that the mature C protein, in the absence of other viral components, is able to associate to LDs.

Specific amino acids in the $\alpha 2$ helix are involved in C association to LDs

The molecular basis of C protein association to LDs was then investigated. To this end, we used the model proposed for DENV C interaction with cellular membranes based on the structural information previously obtained by NMR [25]. The model implicates a concave shaped hydrophobic cleft including amino acids of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ helices and the connecting loop (Fig. 3A, left panel). We also considered the information provided in previous analysis describing a flavivirus conserved internal hydrophobic region, spanning amino acids 46 to 66 ($\alpha 2$ and $\alpha 3$) in DENV, which was proposed to interact with ER membranes [9]. Amino acids substitutions of residues around the hydrophobic cleft were designed in the context of the full length DENV genome as described in Fig. 3A, and localization of the C protein was followed by confocal microscopy after RNA transfection. Substitutions of uncharged amino acids in $\alpha 1$ helix or in the $\alpha 1$ - $\alpha 2$ connecting loop resulted in C proteins that accumulated in LDs, similar to that observed with the WT virus (Fig. 3B). In addition, deletion of the complete $\alpha 2$ helix or substitution of hydrophobic amino acids within $\alpha 3$ resulted in the synthesis of an unstable C protein that was barely detected by immunofluorescence (data not shown). Interestingly, a substitution of the two hydrophobic residues (L50 and L54) within $\alpha 2$ that are facing outwards from the $\alpha 2$ - $\alpha 2'$ plane, rendered a C protein that was distributed throughout the cytoplasm without evident association to LDs (Fig. 3B, Mut $\alpha 2$), providing evidence of an important role of these amino acids in C protein-membrane association.

To better define the role of L50 and L54 on C targeting to LDs, we designed the individual mutants L50S (Mut $\alpha 2.1$) and L54S (Mut $\alpha 2.2$). Localization of C after RNA transfection showed a defect in the distribution of these proteins in the cytoplasm when compared with the WT (Fig. 3C). We observed the presence of Mut $\alpha 2.1$ and Mut $\alpha 2.2$ C proteins throughout the cytoplasm; however, in contrast to that observed with the Mut $\alpha 2$, small patches of Mut $\alpha 2.1$ and Mut $\alpha 2.2$ C proteins were detected on LDs (Fig. 3C). These results indicate that both amino acids, L50 and L54, are necessary for proper targeting of C to LDs.

Mutant $\alpha 2$ retains the ability to bind RNA and to dimerize in solution

To investigate whether the mutation L50S-L54S alters C protein folding, dimerization, or RNA binding, biochemical

properties of the recombinant proteins were analyzed. The mature WT and mutated C proteins were cloned in an expression vector in the absence of a tag. Purification was performed by heparin columns and gel filtration. Expression and purification of the C_{L50S/L54S} mutant were indistinguishable from the WT protein (Fig. 4A). The oligomerization state of the proteins was determined by size exclusion chromatography and light scattering. Single picks corresponding to molecular weights of 23.8 and 24.9 kDa were obtained for the C_{WT} and the C_{L50S/L54S} respectively, which are consistent with dimer formation.

To determine whether the mutation could interfere with the ability of the C protein to bind RNA, mobility shift and filter binding assays were performed to estimate the dissociation constants. A radiolabeled RNA was used for titration with different concentrations of C_{WT} or C_{L50S/L54S}. The dissociation constants were not significantly different, 22 nM and 20 nM for the WT and the mutant, respectively (Fig. 4B and 4C). The results indicate that the L50S-L54S mutation introduced in the C protein did not alter protein folding or other known properties of the protein.

Association of C to LDs is necessary for DENV replication

To investigate the effect of mutating C on DENV replication, cells were transfected with WT or mutant RNAs that produce stable C proteins (Mut $\alpha 1$, Mut $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop, Mut $\alpha 2$, Mut $\alpha 2.1$, and Mut $\alpha 2.2$). Viral replication in transfected cells was evaluated by immunofluorescence as a function of time and by assessing the production of infectious viral particles by plaque assay. Mut $\alpha 1$ and Mut $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop produced titers similar to the WT at 24, 48 and 72 h (Fig. 5A). After 96 h the titers decreased due to extensive cytopathic effect and death of the transfected cells. In contrast, the titers for Mut $\alpha 2.1$ and Mut $\alpha 2.2$ were about two orders of magnitude lower than that for the parental virus. In addition, no viral particles were detected in the supernatants of cells transfected with Mut $\alpha 2$ up to 5 days post-transfection (Fig. 5A). Furthermore, the immunofluorescence assays indicated that while the WT, Mut $\alpha 1$, and Mut $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop showed the complete monolayer antigen-positive for DENV at day 3, Mut $\alpha 2.1$ and Mut $\alpha 2.2$ showed a propagation delay, and no viral propagation was detected in cells transfected with Mut $\alpha 2$ until day 15 (data not shown). The results indicate that mutations that alter C targeting to LDs produced defects in viral replication.

To investigate whether the viruses carrying the mutations in the $\alpha 2$ helix produced viral particles that were not infectious, we determined the presence of the viral envelope (E) protein in the media. Western blot analysis indicated that the amount of the E protein released from cells transfected with Mut $\alpha 2.1$ and $\alpha 2.2$ was less than 5% of that observed with the WT (Fig. 5B). In addition, the E protein was undetectable in the media of cells transfected with Mut $\alpha 2$ RNA. Moreover, viral RNA was quantified in the media of cells infected with WT, Mut $\alpha 2.1$, and $\alpha 2.2$ using real time RT-PCR (Fig. 5C). The amount of viral RNA detected for both mutants was about two logs lower than that for the parental virus, which correlated with the amount of infectious particles produced in Fig. 5A. These results indicate that the mutations in the $\alpha 2$ helix of the C protein impair the production of DENV particles.

Dissecting cis-acting RNA replication signals from the C coding sequence

We have recently developed a DENV reporter system to evaluate each step of DENV replication [33]. To further characterize the defect of the DENV C mutants, we introduced the substitutions in the reporter virus (DV-R). Controls and

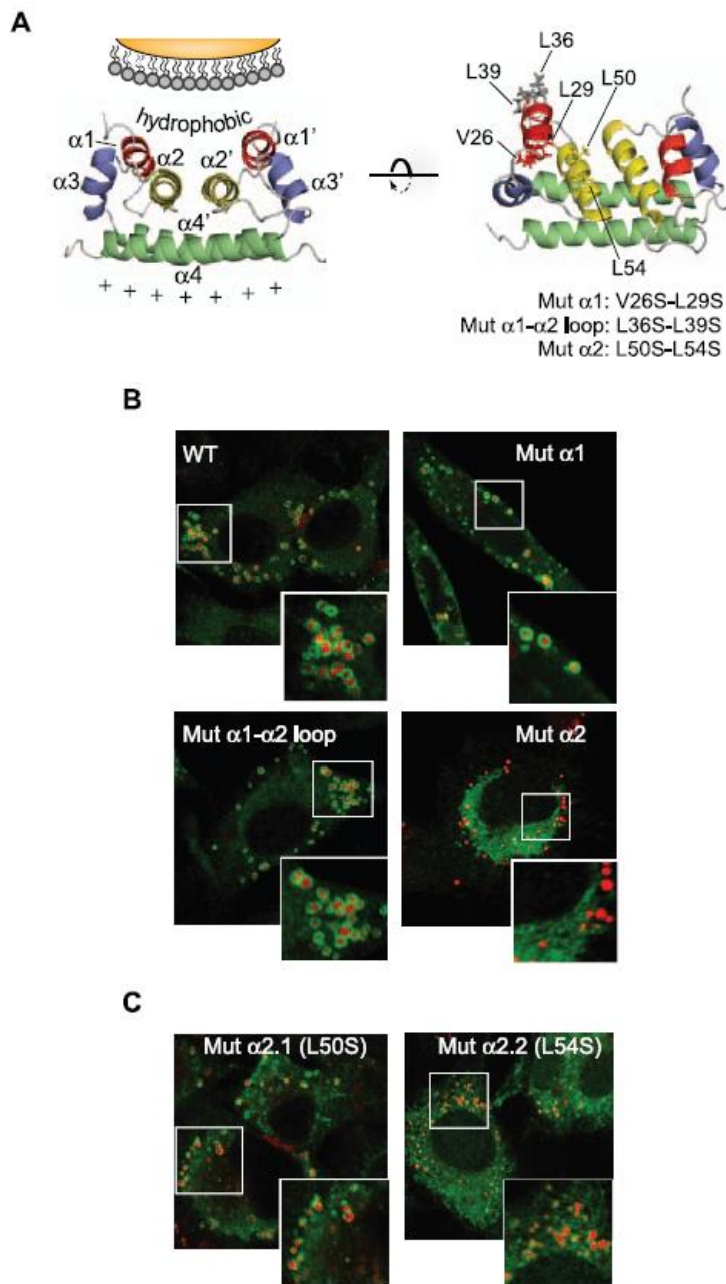


Figure 3. Amino acids within the $\alpha 2$ helix of C are necessary to direct the protein to LDs. **A.** Ribbon diagram of the dimer structure of DENV C protein [25]. The four α helices ($\alpha 1$ to $\alpha 4$) are indicated in each monomer. The hydrophobic cleft proposed to interact with membranes is also shown. On the right, the location of amino acids that were mutated in the DENV infectious clone is indicated in the structure (Mut $\alpha 1$, Mut $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop, and Mut $\alpha 2$). **B.** Distribution of the C protein and lipid droplets in cells transfected with mutated DENV RNAs. BHK cells transfected with the WT or mutated RNAs containing the substitutions indicated in A were analyzed by immunofluorescence and confocal microscopy. The C protein and lipid droplets were localized by anti-C antibodies (green) and BODIPY (red), respectively. **C.** Amino acids L50 and L54 are necessary for targeting C to LDs. BHK cells transfected with DENV RNAs carrying the individual substitutions L50S (Mut $\alpha 2.1$) or L54S (Mut $\alpha 2.2$) were used to analyze the localization of the mutated C proteins and LDs as described above.
doi:10.1371/journal.ppat.1000632.g003

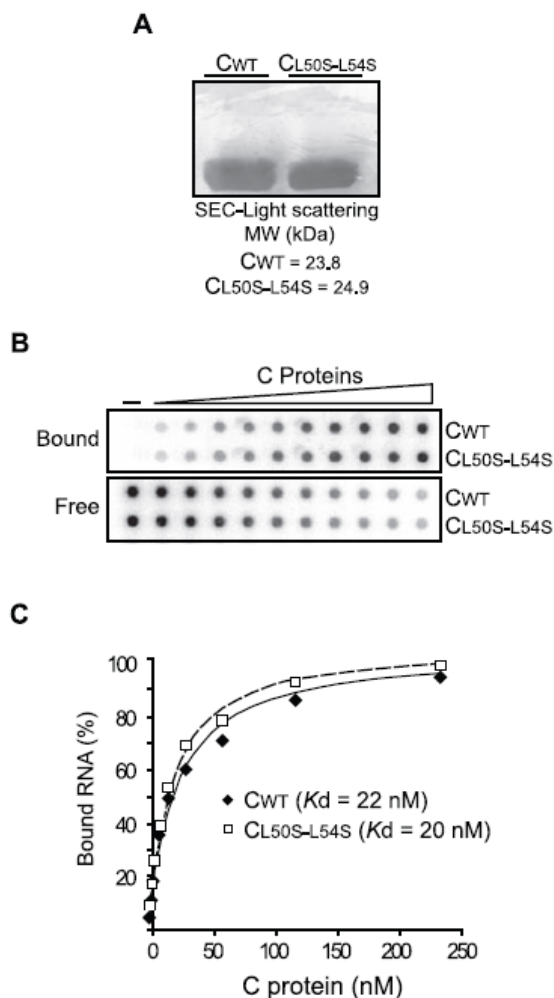


Figure 4. Biochemical properties of recombinant C protein with substitution L50S-L54S. **A.** High expression levels and dimerization of C_{WT} and C_{L50S-L54S}. SDS-PAGE stained with coomassie blue showing similar expression levels of the recombinant proteins. The molecular mass obtained by size exclusion chromatography (SEC) and light scattering for both proteins are indicated. **B.** Interaction of C_{WT} and C_{L50S-L54S} with the DENV 5'UTR RNA probe monitored by filter binding assay. Uniformly ³²P labeled RNA (0.1 nM) was incubated with increasing concentrations of the respective C protein. Bound indicates RNA-protein complexes retained in the nitrocellulose membrane and free denotes the unbound probes retained in the nylon membrane. The RNA probes bound and free in each membrane were visualized by PhosphorImaging. **C.** Quantification of the percentage of RNA probe bound was plotted as a function of C concentration and fitted using equation 1 (see Materials and methods). The dissociation constants K_ds are indicated inside the plot.
doi:10.1371/journal.ppat.1000632.g004

mutated viral RNAs were transfected in BHK cells and luciferase activity was monitored as a function of time as previously reported [33]. Unexpectedly, transfection of Mut $\alpha 2$ DV-R showed a delayed increase in luciferase activity during viral RNA synthesis (data not shown). Because flavivirus structural proteins do not participate in viral RNA amplification [34,35], this observation

was puzzling. It is possible that the substitution introduced in the $\alpha 2$ helix alters RNA structures present in the C coding sequence that have been previously reported to be involved in genome cyclization and RNA amplification [3]. In fact, the presence of overlapping signals in the viral genome has been a limitation in studying the effect of mutations in the N-terminus of C on viral encapsidation. Thus, to properly analyze the defects in replication of DENV C mutants, we designed a new DENV reporter system dissociating the cis-acting signals from the C coding region. To this end, we introduced a duplication of the first 104 nucleotides of the C coding region, called here the cis-acting element CAE (including the previously described cHP and the cyclization sequence 5'CS) [36–38]. The CAE was fused to the luciferase coding region followed by the complete DENV ORF (Fig. 6A, monocistronic DENV reporter, mDV-R). Between the luciferase and the DENV structural proteins an FMDV2A protease was introduced to ensure the release of the reporter protein. In summary, the new reporter DENV contained a physical separation of the CAE sequences and the C coding region. Transfection of the mDV-R RNA resulted in efficient viral replication and production of infectious viral particles (Fig. 6B and C, WT).

To investigate the replication of mutants in the $\alpha 2$ helix that impair LD association without altering the cis-acting RNA elements, Mut $\alpha 2$, Mut $\alpha 2.1$, and Mut $\alpha 2.2$ were introduced in the mDV-R. The RNAs corresponding to the mDV-R WT, the three mutants in the $\alpha 2$ helix, the propagation impaired mutant containing the complete deletion of C coding sequence (Mut ΔC), or the replication impaired mutant carrying a substitution in the polymerase NS5 (Mut NS5), were transfected into BHK cells (Fig. 6B). The Mut ΔC mDV-R showed luciferase levels at 24 and 48 h post-transfection that were indistinguishable from the WT mDV-R levels, confirming that the C protein is dispensable for RNA synthesis and indicating that the duplication of the CAE was fully functional (Fig. 6B, compare Mut ΔC with the positive and negative controls, WT and Mut NS5, respectively). Similarly, Mut $\alpha 2.1$ and Mut $\alpha 2.2$ translated and replicated the RNA efficiently. In contrast, while the Mut $\alpha 2$ RNA was translated as the parental RNA (see luciferase activity at 4 h post-transfection), the luciferase levels detected at 24 and 48 h were reduced about 40 fold in respect to the WT control (Fig. 6B). These results indicate that while deletion of the complete C protein or the individual mutations L50S and L54S did not affect DENV RNA synthesis, the more drastic change that included both substitutions did, and this effect was not due to alteration of the cis-acting elements.

To analyze the ability of the mutants in the C protein to produce reporter infectious particles, we collected the supernatants of the transfected cells as a function of time and used them to infect fresh BHK cells. As expected, the luciferase activity in cells infected with the media obtained from cells transfected with Mut ΔC was undetectable (Fig. 6C). Similarly, the Mut $\alpha 2$ failed to produce viral particles. After infection with the media of cells transfected with Mut $\alpha 2.1$ or Mut $\alpha 2.2$, between 50 and 200 fold lower luciferase activity than that with WT mDV-R was observed. These results confirm a direct role of amino acids L50 and L54 on viral particle formation.

The decreased level of RNA amplification of Mut $\alpha 2$ presented in Fig. 6B was unexplained; thus, we decided to further analyze this observation. Knowing that the C protein has high affinity for RNA molecules, a plausible explanation could be that a mistargeted C protein, which accumulates in the cytoplasm, prematurely binds the viral RNA or interacts with other factor involved in viral RNA replication. To analyze this possibility, we studied the RNA synthesis of WT DENV in cells producing the WT or mutated C proteins in trans. BHK cells expressing a

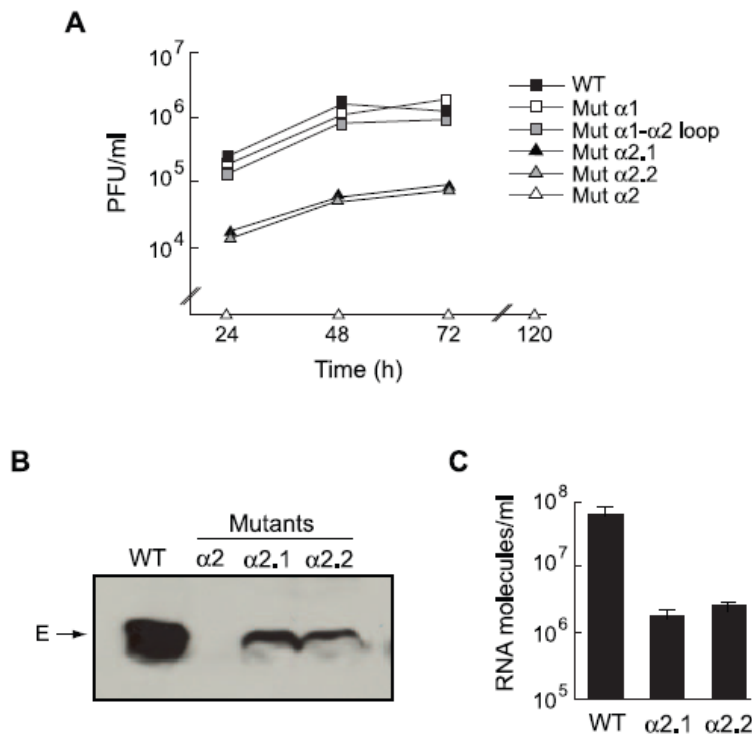


Figure 5. Targeting the C protein to LDs is necessary for DENV production. **A.** The media of BHK cells transfected with DENV RNA WT or mutants (Mut $\alpha 1$, Mut $\alpha 1-\alpha 2$ loop, Mut $\alpha 2$, Mut $\alpha 2.1$, and Mut $\alpha 2.2$) were collected as a function of time post-transfection and used to quantify the amount of infectious particles by plaque assay in BHK cells. The plot indicates the plaque forming units per ml at different times post-transfection. **B.** The secreted enveloped protein E was analyzed in the supernatant of transfected cells by western blot as previously described [33]. **C.** BHK cells were infected with a multiplicity of infection of 0.1 of WT, Mut $\alpha 2.1$, and Mut $\alpha 2.2$ viruses. The viral RNA was quantified by real time RT-PCR in the media obtained 24 h post-infection.

doi:10.1371/journal.ppat.1000632.g005

mature form of C_{WT} or $C_{L50S154S}$ were transfected with the WT reporter DENV RNA, and luciferase activity was monitored as a function of time. Over-expression of C_{WT} or $C_{L50S154S}$ proteins was not toxic for BHK cells as determined by MTS assays. Cells expressing C_{WT} showed accumulation of the viral protein in LDs, while the ones expressing $C_{L50S154S}$ showed a cytoplasmic distribution without a significant accumulation in LDs (Fig. 6D, right panel). Luciferase activity was determined in cells at 4, 24, 48 and 72 h post-transfection (Fig. 6D). Cells expressing the C_{WT} showed luciferase levels at 48 and 72 h about 10 and 30 fold higher, respectively, than those in cells expressing the $C_{L50S154S}$. These results suggest that the mutated protein expressed in trans was able to decrease the level of viral RNA amplification.

Taken together, the new reporter DENV allowed us to dissociate the processes of RNA replication and encapsidation, demonstrated that C is dispensable for RNA synthesis, and confirmed an important role of amino acids L50 and L54 in viral particle formation. In addition, the results suggest that a mislocalized C protein could interfere with viral RNA synthesis, providing evidence for a possible role of LDs in coordinating different viral processes.

LDs as target for DENV inhibition

Here, we found that targeting C protein to LDs is necessary for DENV particles formation. In addition, we observed that viral

infection increases the amount of LDs. Based on these findings, we hypothesized that interfering with LDs formation/metabolism could be a means for antiviral intervention. To prove this idea, we used a fatty acid synthase inhibitor (C75) that was previously designed for obesity control [39–41]. It has been reported that this drug reduces the amount of LDs in the cell and inhibits pre-adipocyte differentiation. First, we analyzed the effect of C75 on the amount of LDs in DENV-infected and non-infected cells. The concentration of drug used was determined to be non-toxic for BHK cells (data not shown). Quantitative analyses of LDs in BHK cells showed that concentrations between 10 and 20 μM of drug decreased the amount of LD in DENV-infected and mock-infected cells (Fig. 7A). To determine the effect of C75 on viral replication, cells were treated with 10 and 20 μM of compound, infected with DENV2 using a multiplicity of infection of 1, and viral titers were determined at 24 and 48 h post-infection by plaque assay (Fig. 7B). Using 20 μM of C75, a drop in two orders of magnitude in the viral titer at 48 h and complete inhibition of viral replication at 24 h were observed. Similar results were obtained when C75 treated HepG2 cells were infected with DENV (data not shown). To determine how the drug affects each step of viral replication, the reporter DENV was used. Luciferase activity was measured in extracts of BHK cells infected with mDV-R in the presence or absence of C75. At 10 h post-infection the luciferase levels were unaffected by the inhibitor, suggesting that the drug was not

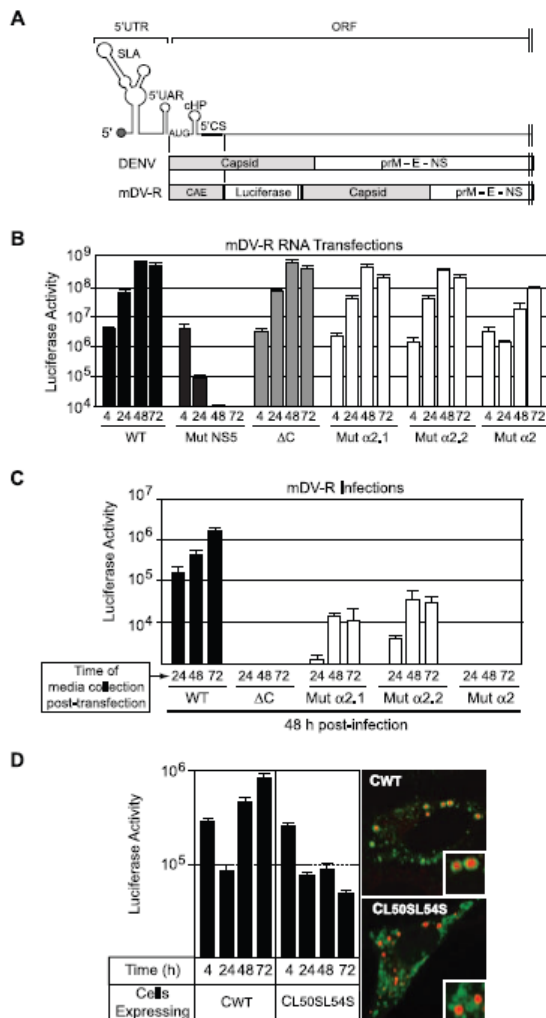


Figure 6. A new reporter virus that allows dissociation of cis-acting RNA elements from the capsid coding region confirms a role of L50 and L54 in DENV particle formation. **A.** Construction of a novel monocistronic DENV reporter system. At the top, schematic representation of the cis-acting replication elements located at the 5' end of the DENV genome. The promoter stem-loop A (SLA), the cyclization sequence upstream of the AUG (5'UAR), the replication element cHP, and the cyclization sequence 5'CS are indicated. In the middle, the corresponding region of DENV polyprotein is shown. At the bottom, a schematic representation of the monocistronic DENV reporter construct (mDV-R) showing the duplication of the cis-acting elements (CAE) and the location of the luciferase and the viral proteins. **B.** Translation and replication of mutant mDV-R RNAs. BHK cells were transfected with DENV RNAs corresponding to the mDV-R WT, Mut Δ C with the complete deletion of C coding sequence, Mut α 2,1, Mut α 2,2, Mut α 2, which carries a mutation in the catalytic GDD motif of the viral polymerase. Luciferase activity was measured as a function of time for each RNA as indicated at the bottom. **C.** Mutations in the α 2 helix of the C protein impair viral particle formation. The media of the transfected cells from the experiment shown in B was collected at the indicated times and used to infect fresh cells. Luciferase activity was measured 48 h post-infection for each virus as indicated at the bottom. **D.** A matured form of $C_{L50SL54S}$ protein expressed in BHK

cells decreased the levels of DENV RNA synthesis. Immunofluorescence of BHK cells expressing the DENV C_{WT} or $C_{L50SL54S}$ probed with anti C (green) and stained with Bodipy (red) for lipid droplets are shown in the right panel. The cells transfected with DV-R RNA WT were used to measure luciferase activity as a function of time, as indicated in the left panel.

doi:10.1371/journal.ppat.1000632.g006

interfering with viral entry or translation (Fig. 7C, left panel). At 24 and 48 h post-infection a reduction of luciferase levels of about 4-fold was observed, which corresponds to a decrease in RNA amplification. To investigate the effect of the drug on infectious viral particle formation, the media from cells subjected to each treatment was collected 48 h after infection and used to infect fresh cells in the absence of C75. At this time, an inhibition of more than 1000-fold was observed, indicating a profound effect of C75 on viral particle production (Fig. 7D). These results indicate that altering the LD metabolism can be a means to block DENV replication.

Discussion

Genome packaging is one of the most obscure steps of the flavivirus life cycle. Here, we provide the first evidence linking DENV particle formation with ER derived LDs. We found that DENV infected cells accumulate the C protein around LDs and this localization is crucial for infectious particle formation. Specific hydrophobic amino acids were identified as key determinants for LD association. In addition, we developed a new genetic tool to exclude cis-acting RNA replication signals from the C coding sequence. Using this system, we found that mislocalization of a mutated C protein interferes with DENV RNA synthesis. Our studies support the idea that DENV exploits LDs for multiple purposes during DENV replication. Furthermore, relevant to the urgent need for antiviral strategies against DENV, we report that pharmacologic alteration of LD metabolism also inhibits DENV replication in cell culture.

Structural features of *Flaviviridae* C proteins and their association to LD

Flavivirus is one of the three genera of the *Flaviviridae* family together with the *Hepacivirus* and *Pestivirus* [2]. The C proteins of the three genera do not exhibit significant sequence homology or common domain organization. However, they are all dimeric, basic proteins with an overall helical fold, responsible for genome packaging. In addition, a recent report has suggested a common RNA chaperone activity for these C proteins [42]. Hepacivirus mature core proteins are about 170 amino acids in length and consist of two domains, a highly basic N-terminal domain (D1) and a hydrophobic C-terminal domain (D2) [43]. In contrast, pestivirus and flavivirus C proteins are shorter, between 90 to 100 residues, lacking a D2 domain. Compelling evidence has been accumulated in recent years supporting the idea that HCV particle formation requires C protein association to LDs, and that the D2 domain is responsible for targeting C to this organelle [28,29,44–49]. Because the flavivirus C proteins lack a D2 domain, an association of DENV C protein to LDs was unexpected.

Using DENV-infected cells, we found that the C protein accumulated on LDs. Hydrophobic residues in the α 2 helix of DENV C were defined as important determinants for LD association and viral particle formation. In contrast, mutations of uncharged residues in α 1 helix or in the connecting loop between α 1 and α 2 helices did not alter LD association or viral propagation. The importance of an internal hydrophobic region

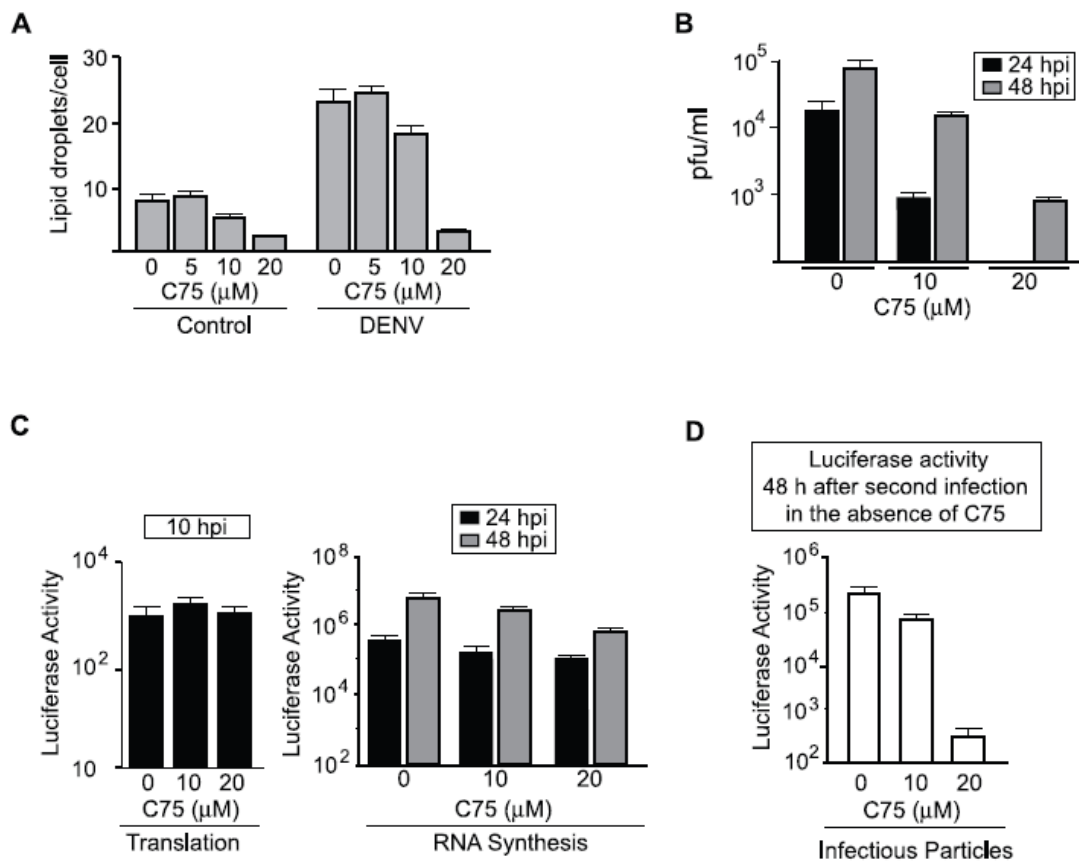


Figure 7. Pharmacological inhibition of lipid droplets accumulation impairs DENV replication. **A.** Effect of C75 on the amount of lipid droplets in BHK cells. The amount of lipid droplets was quantified in BHK cells treated with different concentrations of C75. Control or DENV infected BHK cells were used. **B.** Inhibition of DENV replication in cells treated with C75. The amount of infectious viral particles produced at 24 and 48 h post-infection in BHK cells were evaluated by plaque assays in control or C75 treated cells as indicated. Error bars indicate the SD of three independent experiments. **C.** Effect of C75 on each step of the replication of the mDV-R. Viral stocks of the reporter mDV-R were used to infect BHK cells in the presence and absence C75. Luciferase activity was evaluated at 10 h post-infection to evaluate entry and translation (left panel), and at 24 and 48 h to evaluate RNA synthesis (right panel). **D.** The production of infectious viral particles produced in the experiment described in C was evaluated by infecting fresh BHK cells in the absence of the inhibitor, and assessing the luciferase activity 48 h after infection. doi:10.1371/journal.ppat.1000632.g007

including the $\alpha 2$ helix was originally described in DENV4, and more recently was reported to be necessary for efficient propagation of different flaviviruses [9,50–52]. A recent study using WNV reported that deletions within the most hydrophobic section of $\alpha 2$ helix (LALLAFF) impaired viral propagation [53]. However, pseudorevertants with extended deletions of C from amino acid 40 to 76 were recovered in culture. These results indicated that a large deletion of about 36 amino acids was better tolerated than 4–7 amino acid deletions in the hydrophobic region, suggesting that a short version of the C protein could form nucleocapsids by an alternative mechanism. A remarkable functional flexibility of the C protein was observed in TBEV, in which deletions from 19 to 30 residues were rescued by second site mutations increasing the hydrophobicity of the protein [51,54]. Studies using a YF replicon trans-packaging system demonstrated that large deletions in the N and C terminal regions of protein C were tolerated [50]. In the same report, using a YFV infectious clone, it was shown that the C protein with deletions of the $\alpha 1$ helix resulted in small plaque phenotypes, while deletions

including $\alpha 1$ and $\alpha 2$ were lethal. Using DENV, we observed that mutations of amino acids L50 or L54 within $\alpha 2$ helix of C greatly decrease viral particle formation. These results are in agreement with a previous study, in which a deletion of residues 42 to 59 in DENV C protein in $\alpha 2$ impaired viral propagation [52].

According to our findings, hydrophobic amino acids within the $\alpha 2$ helix in the center of DENV C protein would function as the hepacivirus C-terminus D2 domain in targeting the protein to LDs. We conclude that hepaciviruses use distinct structural features of the C protein for subcellular localization, suggesting a convergent evolution of these viral proteins. It remains to be examined whether the pestivirus C proteins also accumulate on LDs.

Biological significance of LD in DENV replication

Viral infection could modulate a range of host cell functions and usurp the cellular organization to facilitate viral spread. Although viral translation, RNA amplification, and encapsidation must be temporally and spatially regulated in the cytoplasm of the infected

cell, the mechanisms by which flaviviruses coordinate these processes are still unclear. Here, we constructed a new genetic tool to dissociate overlapping signals for DENV RNA replication and encapsidation (mDVR, Fig. 6A). This tool allowed us to confirm that complete deletion of the C protein did not alter viral RNA translation or RNA synthesis. The substitution L50S or L54S, which altered C targeting to LDs, resulted in viruses that translated and replicated the RNA efficiently but had defects in infectious particle production (Fig. 6B and C). These viruses released reduced amounts of viral E protein and viral RNA, supporting the idea that C association to LDs is necessary for viral particle formation (Fig. 5). The double mutant (L50S+L54S), which abolished protein association to LDs and impaired viral particle production, was also found to delay amplification of viral RNA (Fig. 6B, Mut α 2). It is possible that accumulation of this mutated C protein in the cytoplasm could interact with the viral RNA and interfere with genome amplification. A biological role of LDs as transient depots to store or sequester proteins that are in temporary excess has been previously reported [55]. Sequestration of histones on LDs that are released during development has been demonstrated [55]. Therefore, similarly to that observed with histones, LDs could temporally control viral processes by regulating the availability of the highly basic C protein in the cytoplasm of infected cells. Interestingly, localization of C on LDs was also observed in mosquito cells, suggesting a conserved function of these organelles in viral replication in different hosts.

The place and the mechanism by which the C protein recruits the viral RNA to form the nucleocapsid in the infected cell are still unclear. Because a dynamic shift of proteins and lipids between the ER and the LDs has been reported (for review see [30]), it is possible that C is stored on LDs early during infection to be then mobilized to the ER membrane for particle morphogenesis. Alternatively, the genomic RNA could interact with C on the surface of LDs to form the nucleocapsids, which could be then transferred to the ER membrane for new viral particles formation.

We observed that DENV infection increases the amount of LDs per cell (Fig. 1C). A recent functional genomic screen revealed a number of genes involved in LD formation and the regulation of their number, morphology, and distribution in the cell [56]. Thus, it will be important to investigate how DENV alters these pathways to increase the formation of new LDs or change the half life of the already existing ones. In addition, it will be interesting to examine the effect of the C protein on the enzymatic activities involved in lipid metabolism that have been found associated to LDs. In the case of HCV, interaction of the C protein with LDs was linked to increased lipid accumulation and hepatic steatosis in transgenic mice [57,58]. Because liver steatosis has been also observed in DENV-infected mice and fatal cases of DHF in humans [59,60], it is relevant to investigate a possible correlation between LD accumulation in infected tissues and DENV pathogenesis.

The properties of LDs have attracted considerable interest because of the link between enhanced fat storage and human diseases such as obesity, inflammation, and cancer. In recent years different compounds that affect the accumulation and metabolism of LDs have been developed [61–63]. Here, we found that a fatty acid synthase inhibitor (C75) that decreased the amount of LDs in DENV-infected and uninfected cells, also inhibited dengue replication 100 to 1000 fold (Fig. 7B). Using a luciferase DENV reporter system, we observed that C75 did not alter viral entry or viral translation. Although the most pronounced inhibition was observed in the production of infectious viral particle, a low but significant reduction of RNA synthesis was also detected. This effect could be due to alteration of the metabolism of lipids, which

are components of the replication complexes. In addition, the decreased amount of LDs observed with C75 could account for the large reduction in viral particles produced.

Currently, dengue fever and dengue hemorrhagic fever are a tremendous social and economic burden on the world population. We believe that uncovering molecular details of the DENV life cycle and understanding the host pathogen interaction will aid the search for novel anti-dengue strategies.

Materials and Methods

Ethics statement

Research involving animals was approved by the IACUC of the Leclair Institute fully complying with the National Institute of Health (NIH, USA) guidelines.

Cells and viruses

Baby hamster kidney cells (BHK-21) were cultured in minimum essential medium alpha supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin. Human hepatocellular liver carcinoma cell line (HepG2) was cultured in minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 0.01% sodium pyruvate. C6/36 HT mosquito cells from *A. albopictus*, adapted to grow at 33°C, were cultured in L-15 Medium (Leibovitz) supplemented with 0.3% tryptose phosphate broth, 0.02% glutamine, 1% MEM non-essential amino acids solution and 5% fetal bovine serum. Stocks of DENV serotype 2 16681 were prepared in mosquito C6/36 cells and used to infect the different cell lines as indicated in each case.

Construction of recombinant DENVs

The desired mutations were introduced in a DENV type 2 cDNA clone [64] (GenBank accession number U87411) by replacing the *SacI-SphI* fragment of the WT plasmid with the respective fragment derived from an overlapping PCR. The sequence of the oligonucleotides used as primers for all the PCR reactions are listed in Table 1. To generate the plasmids carrying the mutations L50S, L54S, L50S–L54S, L36S–L39S and V26S–L29S, common outside primers 101 and 239 were used. Mutation L50S was generated using the inside primers 1035 and 1036, mutation L54S using primers 1037 and 1038, mutation L50S–L54S using primers 833 and 832, mutation L36S–L39S with primers 1050 and 1049, and mutation V26S–L29S with primers 1054 and 1053.

Bicistronic dengue virus reporter constructs (DV-R) containing the reporter Renilla luciferase was previously described [33]. The monocistronic DENV reporter construct was built using a previously described plasmid pD2/ICA/III [35] including an additional *NotI* restriction site at nucleotide 244 (pD2/ICA/III-*NotI*). To facilitate insertion of the *Renilla luciferase* gene (*Rluc*), we generated an intermediate plasmid derived from pRL-CMV (Promega). Using unique *SacI* and *BstBI* restriction sites, we introduced the complete DENV 5'UTR followed by the first 104 nucleotides of the coding sequence of C, using primers 101 and 7. The resulting plasmid was used to introduce downstream of *Rluc* the FMDV2A protease coding sequence (QLLNFDLKLKLAGD-VESNPGP) fused to the capsid protein. The fragment carrying FMDV2A fused to DENV sequences was generated by overlapping PCR using the first PCR primers 273 and 516, and for the second PCR primers 517 and 241. The overlapping PCR product was digested with *SacI-NotI* restriction enzymes and introduced into homologous restriction sites within pD2/ICA/III-*NotI*. To generate mDV-R Mut L50S, mDV-R Mut L54S, and mDV-R

Table 1. Sequence of oligonucleotides.

#	Sequence
7	GTGGGTTTGAAAGTGAGAATCTCTTTGTGACGCT
101	TCCAGACTTTACGAAACACG
239	TCTGTGAT GGAAGCTGTGG
241	TTTGACATTCTATGCAACG
273	GAATTCGAGCTCACGCGTAAATTTAATACGACTCACTATAAGTTGTTAGTCTACGTGG
487	ATCTCTCCATGGGTAATAACCAACGGAAAAAGGCG
489	TGCAGAGGATCTCTATTATCTGCTCTCTATTCAAGATG
516	GACGCTCCCGCAAGCTTGAGAAGGTCAAATCAACAGCTGTTGTTCAATTTTGAAGCTCGC
517	CTTCTCAAGCTTGGGGAGACGTCGAGTCAACCTTGGGCCAATGAATAACCAACGGAAAAAGGCG
595	GTGATGATTTACAAAAATGTTTATTGAATCGG
832	GGAAACGTGAGAACGCCACTGAGGCCATGAACAGTTTTAATGG
833	CATGGCCTCAGTGGCGTCTCACGTTTCTCAACAATCCACC
947	ATCTCTTAAAGATGAATAACCAACGGAAAAAGG
1030	GGCAAGCTTGAATAATCAAATTTAGGAGCTGTTGTTCAATTTTGAAGAAC
1031	TTCTCAAAATGAACAACAGCTCTAAATTTGATTT ACTCAAGCTTGGCGGC
1035	GGAAACGAAGGAACGCCACTGAGGCCATGAACAGTTTTAATGG
1036	CATGGCCTCAGTGGCGTCTCTCGTTTCTCAACAATCCACC
1037	GGAAACGTGAGAACGCCACCAGGCCATGAACAGTTTTAATGG
1038	CATGGCCTGTTGGCGTCTCACGTTTCTCAACAATCCACC
1049	CGTCCCTGTGACATCCCGATGAGAATCTCTTTGTGACG
1050	GAGATTCTCATCGGGAATGTACAGGGACGAGGACC
1054	CCGGTGTGCGACTTCAACAAGTCAACAAGAGATTCTCACTTGG
1053	CTCTTGTGACTGTTGTGAAGTCGACACGCGGTTTCTCTCGC

doi:10.1371/journal.ppat.1000632.t001

Mut L50S–L54S an overlapping PCR was performed with the common primers 595 and 239. The sense and antisense primers used to generate each of the mutations were the same as described above. For mutant mDV-R ΔC, a fragment carrying the deletion of mature C protein was generated by overlapping PCR using the following primers: PCR1 primer sense 595 and primer antisense 1030; and PCR2 primer sense 1031 and primer antisense 239. The overlapping PCR product was cloned into the mDV-R cDNA using the unique restriction sites *SacI*-*SphI*.

RNA transcription, transfection, and viral recovery

Wild-type (WT) or mutant DENV plasmids were linearized with *XbaI* and used as templates for T7 RNA polymerase transcription in the presence of m7GpppA cap analog. RNA transcripts (5 μg) were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) into BHK-21 or HepG2 cells grown in 60-mm-diameter tissue culture dishes. Supernatants were harvested at the indicated times post-transfection and used to quantify infectious DENV particles by plaque assays as previously described [35]. Quantification of viral RNA was performed by real time RT-PCR using TaqMan technology as previously described [35].

Immunofluorescence assay

BHK-21, HepG2, and C6/36 cells were seeded into 24-well plates containing glass coverslips. Twenty four hours after, they

were infected with a DENV2 stock using a multiplicity of infection of 10. At the indicated times the coverslips were removed and the cells were fixed in paraformaldehyde 4%, sucrose 4%, PBS pH 7.4 at room temperature for 20 minutes. Alternatively, they were fixed in methanol for 20 minutes at -20°C . Cells were then permeated with 0.1% Triton X-100 for 4 minutes at room temperature. Rabbit polyclonal antibodies against C were obtained in our laboratory as describe below. A 1:1000 dilution of this anti-C antibody in PBS–0.2% gelatin was used. Goat anti-rabbit IgG Cy3 conjugated (Jackson Immuno Research) were used at 1:500 dilution. For lipid droplets staining cells were incubated with BODIPY 493/503 (4,4-difluoro 1,3,5,7,8 pentamethyl 4-bora 3a,4a-diaza-s-indacene) (Molecular Probes) at 1:500 dilution, 1 μM. For detection of ADRP, a commercial mouse monoclonal antibody (ARP American Research Products, Inc) was used 1/100 in PBS-gelatine. Cy5 AffiniPure Donkey Anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch) was used 1/500 in PBS-gelatine. Cells were mounted on glass slides and images were obtained with a Zeiss axioptan confocal microscopy. To maintain the consistency of the green color for the C protein, the color of BODIPY was changed to red. For immunofluorescence of transfected cells, the procedure was the same as the one described for infections.

Purification of recombinant C protein in *E. coli* and production of antibodies

The coding sequences of the mature C protein (amino acids 1–100) were obtained by PCR from the DENV type 2 cDNA clone [64] using the sense primer 487 carrying the restriction site *NcoI* and the antisense primer 489 with the restriction site *BamHI*. The PCR product was digested and cloned into the expression vector pET-15b (Novagen). Protein expression was performed in the *E. coli* strain BL21 Rosetta (DE3)pLysS (Novagen). The bacterial culture was grown at 37°C until $\text{OD}_{600} = 1$, induced with 1 mM IPTG and incubated at 18°C overnight. C protein from soluble fraction was first purified using heparin affinity chromatography, eluted with a gradient from 0.2 M to 2 M of NaCl in 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5). Fractions containing the protein were collected and further purified by size exclusion chromatography using a Superdex 75 column (GE Healthcare). Highly purified fractions of C protein were aliquoted and stored at -70°C in eluted buffer containing 200 mM NaH_2PO_4 (pH 6) and 500 mM NaCl. Polyclonal antibodies were obtained by inoculating rabbits three times with 0.2 mg of the purified C protein with Freund's adjuvant (SIGMA). Four days before sacrificing the animals, a booster of C without the adjuvant was injected. The antibodies obtained were evaluated for specificity using western blots and ELISA employing infected and non-infected BHK cell extracts and supernatants.

Eukaryotic expression of mature C protein

The coding sequences of the mature C protein (amino acids 1 to 100) derived from DENV type 2 were obtained by PCR using the sense primer 947 carrying the restriction site *AflIII* and the antisense primer 489 with the restriction site *BamHI*. The PCR product was digested and cloned in the eukaryotic expression plasmid pcDNA6/V5-HisB (Invitrogen). Purified plasmid (2 μg) was transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) into BHK-21 cells grown in 24-well plates containing a 1-cm² coverslip. At different time points after transfection the coverslips were fixed and directly used for IFA.

Lipid droplet counting

Cells were fixed as described for the immunofluorescence assay and then treated as follows: rinsed in 0.1 M cacodylate buffer,

incubated with 1.5% OsO₄ (30 min), rinsed in H₂O, immersed in 1.0% thiocarbohydrazide (5 min), rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, incubated in 1.5% OsO₄ (3 min), rinsed in distilled water, and then dried for further analyses. The morphology of fixed cells was observed, and lipid droplets were enumerated by light microscopy with ×100 objective lens. The total amount of lipid droplets was counted in 50 consecutive cells. For each determination the experiment was done in triplicates.

Isolation of lipid droplets by subcellular fractionation

Lipid droplets were isolated by sucrose gradients as we previously described [41]. Briefly, DENV infected BHK cells in 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM KCl buffer (pH 7.4) containing a protease inhibitors cocktail were disrupted by nitrogen cavitation at 700ψ for 5 min at 4°C and collected in an equal volume of buffer containing 1.08 M sucrose. The homogenates were centrifuged to remove the nucleus and the supernatant were overlaid with 2 ml each of 0.27 M sucrose buffer, 0.13 M sucrose buffer, and top buffer (25 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, and 1 mM EGTA). The gradient was centrifuged at 250,000 g 1 h at 4°C. The fractions collected from the top contained LD, cytosol, microsomal fraction, and pellet. Proteins from these fractions were precipitated overnight with TCA, washed with cold acetone, and analyzed by western blot using anti-C and anti-ADRP (guinea pig anti-ADRP polyclonal antibodies, Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ). The activity of lactate dehydrogenase (LDH) was measured using the CytoTox 96 kit (Promega) to discard cytosolic contamination in the LD fraction.

RNA-binding assays

The interaction of the C protein with RNA was analyzed by filter-binding assays (FBA). Uniformly ³²P-labeled RNA probe corresponding to the viral 5' terminal region (nucleotides 1–160) was obtained by in vitro transcription using T7 RNA polymerase and purified on 5% poly-acrylamide gels–6 M urea. The binding reactions contained 50 mM NaH₂PO₄ (pH 6), 150 mM NaCl, 0.02% tween 20, 0.1 nM ³²P-labeled probe, and increasing concentrations of C protein (0, 3.75, 7.5, 15, 30, 60, 125, 250, 500, and 1000 nM). For FBA, Nitrocellulose (Protran BA 85, Whatman-Schleider & Schuell) and Hybond N+ nylon (Amersham Bioscience) membranes were pre-soaked in binding buffer (50 mM NaH₂PO₄ (pH 6), 150 mM NaCl, 0.02% tween 20 and assembled in a dot-blot apparatus. A 20-μL aliquot of each protein–RNA mixture was applied to the filters and rinsed with 100 μL of binding buffer. Membranes were air-dried and visualized by PhosphorImaging analysis. The macroscopic binding constants were estimated by nonlinear regression (Sigma Plot), fitting Equation 1: Bound % = Boundmax·[Prot]/(K_d+ [Prot]), where Bound % is the percentage of bound RNA, Boundmax is the maximal percentage of RNA competent for binding, [Prot] is the concentration of purified C protein, and K_d is the apparent dissociation constant.

References

- World Health Organization (2009) Disease Outbreak News. http://www.who.int/csr/don/archive/disease/dengue_fever/en/.
- Lindenbach BTH, Rice CM (2007) Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven. pp 1101–1152.
- Villordo SM, Gamarnik AV (2009) Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res* 139: 230–239.
- Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L, et al. (2006) A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev* 20: 2238–2249.
- Nowak T, Farber PM, Wengler G (1989) Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins

Determination of C protein molecular weight by Static Light Scattering (SLS)

The average molecular weight (MW) of the proteins was determined on a Precision Detector PD2010 light-scattering instrument tandemly connected to an FPLC system and a LKB 2142 differential refractometer. Five hundred μl of C protein (1 mg/ml) were loaded on a Superdex 75 HR 10/30 (24 ml) column, size exclusion was performed at 0.4 mL/min with a running buffer of 200 mM NaH₂PO₄ (pH 6.0) and 500 mM NaCl. The 90° light scattering, refractive index, and absorbance of the eluting material were recorded on a PC computer and analyzed with the Discovery32 software supplied by Precision Detectors. The 90° light scattering detector was calibrated using BSA as a standard.

Studies with the inhibitor C75

The compound C75, a fatty acid synthase (FAS) inhibitor, was purchased from Cayman chemicals. For lipid droplet enumeration in the presence of C75, 5.0×10⁴ BHK-21 cells were seeded per well in 24-well plates containing a 1 cm² coverslip and allowed to attach overnight. Cells were mock-infected or DENV-infected (MOI of 10). The inoculum was removed 1 h post-infection and 0.5 ml of fresh medium supplemented with 2% fetal bovine serum was added in the presence of 0, 5, 10, or 20 μM of C75. At the indicated time points post-infection, the slides were fixed and directly used for lipid droplet enumeration. Cell viability in the presence of C75 was determined by MTS assay (Cell titer 96[®]Aqueous Non-Radioactive Cell proliferation Assay, Promega). To evaluate the effect of C75 on DENV replication, the above protocol was used and the supernatants harvested at 24 and 48 h post-infection were used for virus quantification by plaque assay. For studies using the reporter virus carrying luciferase, a viral stock of mDV-R was first prepared by RNA transfection of BHK cells. This stock was used to infect cells in the presence of 0, 10, or 20 μM of C75. Luciferase activity was evaluated at 10, 24 and 48 h post-infection. After 48 h of infection, the supernatant was collected and used to evaluate the release of mDV-R particles by infecting fresh BHK cells in the absence of C75. Luciferase activity was then measured 48 h after infection.

Acknowledgments

The authors thank Richard Kinney for DENV cDNA infectious clone and members of Gamarnik's laboratory for helpful discussions. We also thank Dr. Gaston Paris, Dr. Julio Caramelo, Dr. Diego Alvarez and Clarissa Maya-Monteiro for technical help and advice; and Dr. Joan Boccino for useful comments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MMS JAM NGI IAM GBL ATDP PTB AVG. Performed the experiments: MMS JAM NGI IAM GBL. Analyzed the data: MMS JAM NGI ATDP PTB AVG. Contributed reagents/materials/analysis tools: PTB. Wrote the paper: MMS JAM NGI AVG.

allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 169: 365–376.

- Yamshchikov VE, Compans RW (1994) Processing of the intracellular form of the west Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: an in vitro study. *J Virol* 68: 5765–5771.
- Amberg SM, Nestorowicz A, McCourt DW, Rice CM (1994) NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies. *J Virol* 68: 3794–3802.
- Stocks CE, Lobigs M (1998) Signal peptidase cleavage at the flavivirus C-prM junction: dependence on the viral NS2B-3 protease for efficient processing requires determinants in C, the signal peptide, and prM. *J Virol* 72: 2141–2149.

9. Markoff I, Falgout B, Chang A (1997) A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. *Virology* 233: 105–117.
10. Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, et al. (2005) Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J Virol* 79: 3448–3458.
11. Westaway EG, Khromykh AA, Kenney MT, Mackenzie JM, Jones MK (1997) Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus. *Virology* 234: 31–41.
12. Wang SH, Syu WJ, Huang KJ, Lei HY, Yao CW, et al. (2002) Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. *J Gen Virol* 83: 3093–3102.
13. Sangiambut S, Kedapang P, Aaskov J, Puttikhant C, Kasinreuk W, et al. (2008) Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. *J Gen Virol* 89: 1254–1264.
14. Mackenzie JM, Westaway EG (2001) Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol* 75: 10787–10799.
15. Westaway EG, Mackenzie JM, Khromykh AA (2002) Replication and gene function in Kunjin virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 267: 323–351.
16. Welsh S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, et al. (2009) Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5: 365–375.
17. Khromykh AA, Vamavski AN, Sedlak PL, Westaway EG (2001) Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol* 75: 4633–4640.
18. Liu WJ, Chen HB, Khromykh AA (2003) Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J Virol* 77: 7804–7813.
19. Kummerer BM, Rice CM (2002) Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol* 76: 4773–4784.
20. Fijlman GP, Kondratieva N, Khromykh AA (2006) Translation of the flavivirus kunjin NS3 gene in cis but not its RNA sequence or secondary structure is essential for efficient RNA packaging. *J Virol* 80: 11255–11264.
21. Patkar CG, Kuhn RJ (2008) Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. *J Virol* 82: 3342–3352.
22. Wang SH, Syu WJ, Hu ST (2004) Identification of the homotypic interaction domain of the core protein of dengue virus type 2. *J Gen Virol* 85: 2307–2314.
23. Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, et al. (2003) Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol* 77: 7143–7149.
24. Khromykh AA, Westaway EG (1996) RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin. *Arch Virol* 141: 685–699.
25. Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB (2004) Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3414–3419.
26. Dokland T, Wakh M, Mackenzie JM, Khromykh AA, Ee KH, et al. (2004) West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation. *Structure* 12: 1157–1163.
27. Momdjour D, Englert C, Wakita T, Wands JR (1996) Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology* 222: 51–63.
28. Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, et al. (1997) Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1200–1205.
29. Hope RG, McLauchlan J (2000) Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein. *J Gen Virol* 81: 1913–1925.
30. Thiele C, Spandl J (2008) Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol* 20: 378–385.
31. Bozza P, Magalhães KG, Weller PF (2009) Leukocyte lipid bodies — Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta* doi:10.1016/j.bbap.2009.01.005 in press.
32. Martín S, Parton RG (2006) Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 373–378.
33. Mondotte JA, Lozach PY, Amara A, Gamarnik AV (2007) Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J Virol* 81: 7136–7148.
34. Khromykh AA, Westaway EG (1997) Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol* 71: 1497–1505.
35. Alvarez DE, De Lella Ecurra AL, Fucito S, Gamarnik AV (2005) Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 339: 200–212.
36. Clyde K, Barrera J, Harris E (2008) The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis. *Virology* 379: 314–323.
37. Alvarez DE, Filomatori CV, Gamarnik AV (2008) Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs. *Virology* 375: 223–235.
38. Alvarez DE, Lodeiro MF, Ludeña SJ, Pietrasanta LJ, Gamarnik AV (2005) Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol* 79: 6631–6643.
39. Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GI, Townsend CA, Ronnett GV, et al. (2008) Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288: 2379–2381.
40. Kuhajda FP, Landree LE, Ronnett GV (2005) The connections between C75 and obesity drug-target pathways. *Trends Pharmacol Sci* 26: 541–544.
41. Accioli MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, et al. (2008) Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res* 68: 1732–1740.
42. Ivanyi-Nagy R, Lavergne JP, Gabus C, Fichoux D, Daffix JL (2008) RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. *Nucleic Acids Res* 36: 712–725.
43. Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP (2005) Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* 79: 11353–11365.
44. McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Embo J* 21: 3980–3988.
45. Shavinskaya A, Boulant S, Penin F, McLauchlan J, Bartenschlager R (2007) The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly. *J Biol Chem* 282: 37158–37169.
46. Boulant S, Targett-Adams P, McLauchlan J (2007) Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J Gen Virol* 88: 2204–2213.
47. Boulant S, Douglas MW, Moody L, Budkowska A, Targett-Adams P, et al. (2008) Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* 9: 1268–1282.
48. Miyazaki Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, et al. (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9: 1089–1097.
49. Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratiner M, Targett-Adams P, et al. (2006) Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem* 281: 22236–22247.
50. Patkar CG, Jones CT, Chang YH, Warrier R, Kuhn RJ (2007) Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein. *J Virol* 81: 6471–6481.
51. Kofler RM, Heinz FX, Mandl CW (2002) Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. *J Virol* 76: 3534–3543.
52. Zhu W, Qin C, Chen S, Jiang T, Yu M, et al. (2007) Attenuated dengue 2 viruses with deletions in capsid protein derived from an infectious full-length cDNA clone. *Virus Res* 126: 226–232.
53. Schlick P, Taucher C, Schittl B, Tran JL, Kofler RM, et al. (2009) Helices [alpha]2 and [alpha]3 of WNV Capsid Protein are Dispensable for the Assembly of Infectious Virions. *J Virol*.
54. Kofler RM, Leitner A, O'Riordan G, Heinz FX, Mandl CW (2003) Spontaneous mutations restore the viability of tick-borne encephalitis virus mutants with large deletions in protein C. *J Virol* 77: 443–451.
55. Cermelli S, Guo Y, Gross SP, Welte MA (2006) The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Curr Biol* 16: 1783–1795.
56. Guo Y, Walther TC, Rao M, Stuurman N, Goshima G, et al. (2008) Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* 453: 657–661.
57. Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, et al. (1997) Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *J Gen Virol* 78(Pt 7): 1527–1531.
58. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, et al. (1998) The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4: 1065–1067.
59. Paes MV, Pinhao AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, et al. (2005) Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology* 338: 236–246.
60. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, et al. (2001) Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch* 438: 107–115.
61. Namatame I, Tomoda H, Ishibashi S, Omura S (2004) Antiatherogenic activity of fungal beauvericols, inhibitors of lipid droplet accumulation in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 737–742.
62. Koyama N, Kobayashi K, Yamazaki H, Tomoda H (2008) Inhibition of lipid droplet accumulation in mouse macrophages by stemphone derivatives. *J Antibiot (Tokyo)* 61: 509–514.
63. Yamazaki H, Omura S, Tomoda H (2009) Pentaceclides, new inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages produced by *Penicillium cecidicola* FKI-3765-1: II. Structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)*.
64. Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, et al. (1997) Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* 230: 300–308.

Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection

Iranaiá Assunção-Miranda,^{*,†,1} Flavio A. Amaral,^{‡,1} Fernando A. Bozza,[§]
Caio T. Fagundes,[‡] Lirlândia P. Sousa,^{||} Danielle G. Souza,[‡] Patrícia Pacheco,[¶]
Giselle Barbosa-Lima,[¶] Rachel N. Gomes,[¶] Patrícia T. Bozza,[¶] Andrea T. Da Poian,^{*}
Mauro M. Teixeira,^{||,2} and Marcelo T. Bozza^{†,2}

*Programa de Biologia Estrutural, Instituto de Bioquímica Médica, and [†]Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil; [‡]Departamento de Microbiologia and ^{||}Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil; [§]Intensive Care Unit, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, and [¶]Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT Dengue fever is an emerging viral disease transmitted by arthropods to humans in tropical countries. Dengue hemorrhagic fever (DHF) is escalating in frequency and mortality rates. Here we studied the involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dengue virus (DENV) infection and its pathogenesis. Patients with DHF had elevated plasma concentrations of MIF. Both leukocytes from these patients and macrophages from healthy donors infected *in vitro* with DENV showed a substantial amount of MIF within lipid droplets. The secretion of MIF by macrophages and hepatocytes required a productive infection and occurred without an increase in gene transcription or cell death, thus indicating active secretion from preformed stocks. *In vivo* infection of wild-type and *mif*-deficient (*Mif*^{-/-}) mice demonstrated a role of MIF in dengue pathogenesis. Clinical disease was less severe in *Mif*^{-/-} mice, and they exhibited a significant delay in lethality, lower viremia, and lower viral load in the spleen than wild-type mice. This reduction in all parameters of severity on DENV infection in *Mif*^{-/-} mice correlated with reduced proinflammatory cytokine concentrations. These results demonstrated the contribution of MIF to the pathogenesis of dengue and pointed to a possible beneficial role of neutralizing MIF as an adjunctive therapeutic approach to treat the severe forms of the disease.—Assunção-Miranda, I., Amaral, F. A., Bozza, F. A., Fagundes, C. T., Sousa, L. P., Souza, D. G., Pacheco, P., Barbosa-Lima, G., Gomes, R. N., Bozza, P. T., Da Poian, A. T., Teixeira, M. M., Bozza, M. T. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J.* 24, 218–228 (2010). www.fasebj.org

Key Words: MIF • cytokine • lipid droplets • inflammation • hemorrhagic fever • sepsis

DENGUE VIRUS (DENV) infection causes the most important arthropod-borne human viral disease in tropi-

cal and subtropical regions of the world, with an estimated occurrence of 50–100 million cases annually (1–4). The prevalence of dengue fever (DF) has increased dramatically over the past few years, and according to the World Health Organization, ~500,000 patients develop the severe forms of the disease, dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS), with 20,000 deaths each year (5). The situation with DF in the Americas has worsened since the detection of a new serotype of the virus (DENV3), which caused the mortality rate to escalate to 4%. According to the Pan-American Health Organization, the total cases of infection reported in the Americas in 2007 was 850,769, with an increase of 46% of severe forms and 84% of deaths (6).

The causes of disease progression and the mechanisms involved in the physiopathology and lethal outcome of DENV infection have not been clearly defined, but it is believed that viral, host, and environmental factors contribute to the pathogenesis and progression of the disease (4). The lack of adequate therapeutic approaches for the treatment of DF is a consequence of many factors, including our limited understanding of the molecular mechanisms that underlie the interaction between DENV and the human host. One important reason was the lack, until recently, of an animal model that could reflect the complex pathogenesis of severe dengue. Such an animal model has been described and displays the hallmarks of severe disease (7, 8).

An increase in proinflammatory cytokine production

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: M.T.B., Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia, CCS Bloco I, UFRJ, Avenida Carlos Chagas Filho, 373 Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902 Brasil. E-mail: mtbozza@gmail.com; M.M.T., Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627 Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail: mmtex@icb.ufmg.br
doi: 10.1096/fj.09-139469

by cells of patients with DF or DHF and cells infected *in vitro* with DENV was documented previously (9–14). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is among the cytokines found to be increased in the plasma from patients with DF (15). MIF is a proinflammatory mediator expressed in a variety of cell types, not only from the immune system, and released in response to a number of stimuli, such as cytokines, microbial molecules, glucocorticoids, and the immune complex (16–20). The proinflammatory activities of MIF include the induction of inflammatory mediators and the expression of Toll-like receptors and adhesion molecules, counteracting the effect of glucocorticoids, acting as chemoattractants, and increasing the survival of leukocytes (17, 21–25). The effect of MIF is mediated at least in part by activation of the CD74-CD44 receptor complex (26, 27) and CXCR2 and CXCR4 chemokine receptors (25). As observed in septic patients, MIF concentrations positively correlated with gravity and poor outcome in DENV infection (15, 28, 29). The results indicating that MIF participates in the pathogenesis of bacterial sepsis suggest that it would be worth examining the role of MIF as potentially playing an important role in severe forms of dengue. In fact, treatment with neutralizing anti-MIF antibodies or targeted disruption of the *mif* gene protected mice in several relevant experimental models of sepsis and septic shock, in most cases by inhibiting the production of inflammatory mediators such as TNF- α (16, 21, 30). In addition, it has been shown that MIF also affects the host response to viral, protozoan, and helminthic infections (31–36).

The cell sources, the mechanisms of MIF production, and the role of MIF in the pathogenesis of DENV infection are largely unknown. Here, we show that patients with DHF have increased MIF concentrations in their plasma, characterize the mechanisms of MIF production by human macrophages and hepatocytes infected with DENV *in vitro*, and show that *Mif*^{-/-} mice have reduced pathogenesis in a model of severe dengue.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We prospectively enrolled patients admitted recently (48 h) to the Hospital de Clínicas de Niterói, Niterói, Brazil, who had a strong clinical suspicion of a severe form of DENV infection. Patient inclusions occurred during epidemic periods of DENV serotype 3 (DENV3) in the region. Patients with severe forms of dengue were those presenting hemodynamic instability (postural hypotension, reduction of systolic arterial pressure on 20 mmHg in the supine position, or systolic arterial pressure <90 mmHg), hemorrhagic phenomenon (positive tourniquet test, petechiae, equimoses or purpura, mucosal bleeding, digestive hemorrhage, puncture bleeding points), thrombocytopenia (platelet count <50,000/mm³), dehydration/hemoconcentration (increase in hematocrit of 20% or more or plasma extravasation signs, such as ascites, pleural effusion, or hypoproteinemia). Blood samples were

collected between 10 and 12 AM using an arterial line or a peripheral vein. Blood was put on ice, and plasma was collected by centrifugation at 800 g for 15 min at 4°C, portioned into aliquots, and stored at -70°C until the day of analysis. All patients had DENV3 infection confirmed either by anti-DENV ELISA-IgM or serotype-specific RT-PCR. Patients and volunteers were recruited after protocol approval by the institutional review board for human studies (Comitê de Ética em Pesquisas do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil), and an informed consent signature was obtained from the patients themselves or their official representatives.

In vitro DENV infection

Human monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors by density gradient centrifugation on Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and cultured as described previously (19). HepG2, a human hepatocarcinoma cell lineage, was obtained from American Type Cell Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. DENV3 strain 16562 and DENV2 strain 16881 were propagated in C6/36 *Aedes albopictus* mosquito cells. The cells were grown in L-15 medium supplemented with 0.3% tryptose phosphate broth, 0.75 g/L sodium bicarbonate, 1.4 mM glutamine, and nonessential amino acids. After 6 d of propagation, cell debris were removed by centrifugation at 1000 g for 5 min, and the supernatant containing the virus was collected, titrated by a plaque assay on BHK cells, and used for cell infection. Macrophage culture medium was replaced by fresh DMEM without serum and infected at a multiplicity of infection (MOI) of 4 plaque-forming units (PFU)/cell for 2 h at 37°C. After this period, the medium with nonadsorbed virus was changed to DMEM supplemented with 5% heat-inactivated human serum and maintained at 37°C in 5% CO₂. The supernatants of macrophage-infected cultures were collected for cytokine analyses 24 and 48 h postinfection (p.i.). In HepG2 infection, semi-confluent cultures were incubated with MEM without serum and infected with DENV at a MOI of 4 PFU/cell for 1 h. After adsorption, the medium was replaced by MEM with 5% heat-inactivated FCS, and cells were cultured at 37°C in 5% CO₂. After 24 and 48 h of infection, the cell culture supernatants were collected for virus titration and cytokine analyses, and cellular extracts were used for total RNA extraction for real-time PCR analyses. MIF was inhibited by adding to the assay medium a purified goat IgG against human MIF (anti-hMIF; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) to a final concentration of 50 μ g/ml or the inhibitor compound (S,R)-3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid methyl ester (ISO-1) (Calbiochem EMD Biosciences, San Diego, CA, USA) to a final concentration of 100 μ M. DENV3 replication in human macrophages was assessed by quantification of infectious viral particles in culture supernatants collected at different time points after infection by plaque assay in BHK-21 cells. In addition, an RT-PCR assay was used to amplify the virus RNA. The reaction was performed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, with 4 μ g of total RNA extracted with TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The amount of RNA was determined by real-time PCR using TaqMan reagents. Determination of cell viability during infection was performed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase assays with a CytoTox96 nonradioactive cytotoxicity assay kit (Promega Corp. Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions.

In vivo DENV infection

Eight- to 10-wk-old BALB/c [wild-type (WT)] and *Mif*^{-/-} mice, backcrossed into the BALB/c genetic background (generation N10), were bred and maintained at the Bioscience Unit of Instituto de Ciências Biológicas [Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil]. Animals were housed under specific pathogen-free conditions and had free access to commercial chow and water. All procedures had prior approval from the UFMG animal ethics committee. DENV2 strain P23085 was obtained from the State Collection of Viruses (Moscow, Russia). The virus was adapted to adult BALB/c mice by a number of sequential passages of mice of different age infected i.p. (7, 8). For the evaluation of lethality, mice were inoculated i.p. with DENV2, and lethality rates were assessed every 12 h during 14 d. Platelets were counted in a Coulter counter (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA). For determination of hematocrit, a sample of blood was collected into heparinized capillary tubes and centrifuged for 10 min in a hematocrit centrifuge (Fanem, São Paulo, Brazil). For viral titration, mice were killed, and blood was collected immediately. For virus recovery, spleens were collected aseptically and stored at -70°C until assayed for DENV2. Viral load in the supernatants of tissue homogenates and blood samples was assessed by direct plaque assays using LLC-MK2 cells with an agarose overlay plaque assay (7, 8). The neutrophil accumulation in the lung tissue was measured by assaying myeloperoxidase activity, as described previously (37).

Quantification of cytokines

MIF concentrations in the human plasma and in cell culture supernatants were measured by ELISA (R&D Systems) according to the manufacturer's recommendations. A standard curve was generated using a 2-fold dilution series of recombinant human MIF starting at 2 ng/ml up to 30 pg/ml. A multiplex cytokine kit was used to measure TNF- α , IL-6, and IFN- γ in the human plasma, and the assay was performed according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) as described previously (14, 38). Data analyses of all assays were performed with Bio-Plex Manager software (Bio-Rad).

Cytokines in the cell culture supernatants from human macrophages [TNF- α (PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ) and IL-6 (R&D Systems)], and cytokines and chemokines [TNF- α , IFN- γ , IL-6, keratinocyte chemoattractant (KC), and macrophage inflammatory protein (MIP)-2; R&D Systems] in serum and tissue samples from mice were quantified by ELISA using commercially available antibodies according to the procedures supplied by the manufacturer. Prostaglandin (PG) E₂ concentrations in the cell culture supernatants from human macrophages were determined by an enzyme immunoassay (EIA) kit according to the procedures supplied by the manufacturer (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

Alterations in the expression of cytokines in infected macrophages were evaluated by real-time PCR. Total RNA (4 μ g) extracted from the macrophages with TRIzol reagent was reverse transcribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit, and each sample was submitted to real-time PCR using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The reactions were carried out using specific primers for the following genes: human MIF (forward, 5'-GTTCTCTCCGAGCTCAC-CCAGCAGC-3'; reverse, 5'-GCAGCTTGCTGTAGGAGCGGT-TCTG-3'); TNF- α (forward, 5'-CAGAGGGAGAGTTCCCC-AGGGACC-3'; reverse, 5'-CCTTGGTCTGGTAGGAGACGG-3'); and IL-6 (forward, 5'-TGTGAAAGCAGCAAAGAGGCACTG-3'; reverse, 5'-ACAGCTCTGGCTTGTTCCTCACTA-3'). The sam-

ples were subjected to 45 amplification cycles consisting of 95°C for 30 s and 60°C for 1 min. The expression of the glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene was used to normalize the results, which are presented as fold induction of mRNA expression relative to control samples. The analyses of relative gene expression data were performed by the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method (39).

MIF immunolocalization

Human leukocytes obtained from DENV-infected patients were cytopun onto slides, fixed with 3.7% formaldehyde in PBS (pH 7.4) for 10 min, and permeabilized with 0.05% saponin/HBSS solution (5 min). After washing, cytopun preparations were incubated for 1 h at room temperature with goat polyclonal serum anti-hMIF or nonimmune goat IgG diluted in 0.05% saponin/HBSS. After washes in 0.05% saponin/HBSS, the preparations were incubated with biotin-conjugated rabbit anti-goat IgG (Sigma-Aldrich). The MIF immunoreactivity was shown using an ABC Vectastatin glucose-oxidase kit according to the manufacturer's instructions (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and then observed under light microscopy.

To determine the subcellular sites of MIF localization within *in vitro* DENV3-stimulated human monocyte derived-macrophages, the cell preparations were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS (pH 7.4) for 10 min and then permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min. After cell fixation and permeabilization, human macrophages were blocked with 2% normal donkey serum-PBS for 15 min. The cells were then incubated with goat anti-hMIF polyclonal antibody (pAb) (R&D Systems) for 45 min, washed in PBS, and incubated with Alexa Fluor 546-labeled anti-goat IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) along with 1 μ M BODIPY 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) for 1 h to highlight cytoplasmic lipid droplets (LDs) within macrophages. The specificity of the MIF immunolabeling within macrophages was ascertained with normal goat serum (1:100 final dilution; Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) used as an irrelevant control to anti-MIF pAb. Slides were then washed with PBS, and an aqueous mounting medium (Polysciences, Warrington, PA, USA) was applied to each slide before coverslip attachment. Slides were observed under phase-contrast and fluorescent microscopy. Digital photos were taken with a Cool Snap camera (Roper Scientific, GmbH, Ottobrunn, Germany) and processed using Image Pro Express (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

LD staining and enumeration

LDs were stained as described previously (39). In brief, leukocytes on cytopun slides were fixed in 3.7% formaldehyde in Ca²⁺-Mg²⁺-free HBSS (pH 7.4) for 30 min and were stained with osmium tetroxide or BODIPY 493/503. For BODIPY labeling, which reflects the accumulation of neutral lipids in LDs, cells were incubated with 1 μ M BODIPY for 1 h at 37°C. For osmium staining, the slides were rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, incubated with 1.5% OsO₄ (30 min), rinsed in H₂O, immersed in 1.0% thiocarbonylhydrazide (5 min), rinsed in 0.1 M cacodylate buffer, reincubated in 1.5% OsO₄ (3 min), rinsed in distilled water, and then dried and mounted. The morphology of fixed cells was observed, and osmium-stained LDs were enumerated by light microscopy with an \times 100 objective lens in 50 consecutively scanned leukocytes.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Analysis of cytokine concentrations was performed using a Mann-Whitney *U* test or Student's *t* test. Multiple group differences were compared using ANOVA followed by Student-Newman-Keuls *post hoc* analysis. Survival after DENV2 challenge was tested using the log-rank test (GraphPad Prism 4.0). Results with $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

MIF concentration is increased in plasma of patients with DHF

An increase in the MIF concentration in plasma has been documented in a number of inflammatory disorders, including noninfectious and infectious diseases (18, 19). Recent clinical studies indicated that patients with viral infections, such as those caused by hepatitis B virus, West Nile virus, or DENV, have higher MIF plasma concentrations than control subjects (15, 34, 40). In agreement with these data, we found a significant 5-fold increase in MIF concentrations among patients with DHF compared with those in control subjects (Fig. 1A).

Previous studies demonstrated an increase in inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α , and IFN- γ in patients with DHF (9, 10, 14). Accordingly, we also observed a significant increase in plasma concentrations of these cytokines in patients with DHF compared with those in control subjects (Supplemental Fig. 1).

These results confirm that MIF concentrations increase after acute infection with DENV and suggest a correlation between the increase in MIF secretion and the production of other inflammatory mediators during dengue disease.

MIF is stored in LDs accumulated in leukocytes from patients with DHF

LDs are non-membrane-bound, lipid-rich cytoplasmic inclusions that are candidates for playing a major role in the formation of eicosanoid mediators and in the storage of inflammatory mediators including cytokines in inflammatory processes (41). MIF staining of leukocytes from patients with DHF revealed a punctate cytoplasmic pattern, suggestive of MIF localization in LDs (Fig. 1B). Quantification of LDs in leukocytes revealed a significant 3-fold increase in LD accumulation in cells obtained from patients with DHF compared with those of healthy subjects (Fig. 1C). Accordingly, increased LD formation was observed in human macrophages infected with either DENV2 or DENV3 virus but not with heat-inactivated virus compared with control noninfected cells (Fig. 1D and not shown). LDs were further visualized by intracellular labeling with BODIPY, an LD marker that showed colocalization of MIF and LDs in human macrophages infected *in vitro* with DENV3 (Fig. 1E). These results indicate that DENV infection induces the appearance of MIF-posi-

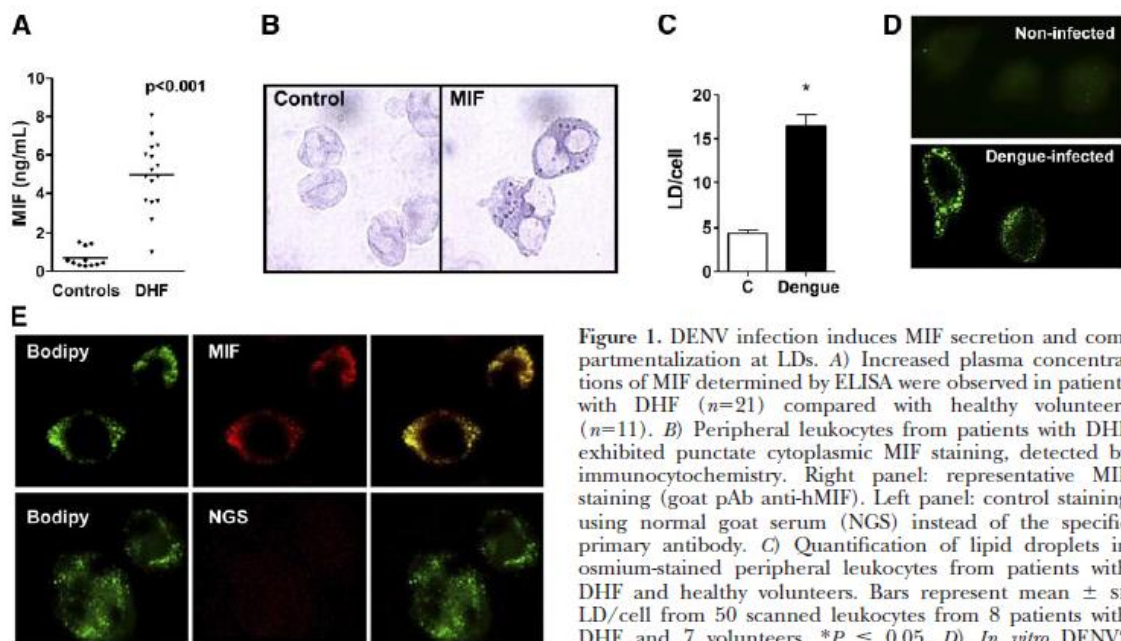


Figure 1. DENV infection induces MIF secretion and compartmentalization at LDs. *A*) Increased plasma concentrations of MIF determined by ELISA were observed in patients with DHF ($n=21$) compared with healthy volunteers ($n=11$). *B*) Peripheral leukocytes from patients with DHF exhibited punctate cytoplasmic MIF staining, detected by immunocytochemistry. Right panel: representative MIF staining (goat pAb anti-hMIF). Left panel: control staining using normal goat serum (NGS) instead of the specific primary antibody. *C*) Quantification of lipid droplets in osmium-stained peripheral leukocytes from patients with DHF and healthy volunteers. Bars represent mean \pm SE LD/cell from 50 scanned leukocytes from 8 patients with DHF and 7 volunteers. $*P \leq 0.05$. *D*) *In vitro* DENV3 infection induced LD formation on human macrophages.

LDs were labeled with BODIPY 24 h after infective DENV3 at a MOI of 4 PFU in cultures of 24 h p.i. *E*) MIF colocalizes with BODIPY-labeled LDs in DENV3-infected human macrophages. Human macrophages infected *in vitro* with DENV3 (MOI of 4 PFU in cultures of 24 h p.i.) were incubated with anti-MIF (top panel) or nonimmune goat serum (bottom panel). Cytoplasmic lipid droplets were visualized by BODIPY 493/503 staining (green). Merged image (right panel) shows colocalization of MIF in BODIPY-labeled LDs.

tive LDs, which are seen in increased numbers in patients with DHF.

Human macrophages and hepatocytes secreted MIF on DENV infection

Because macrophages are known to produce high amounts of MIF and are susceptible to DENV infection (42–44), we investigated whether infection would promote MIF secretion by these cells. *In vitro* infection of human macrophages with DENV2 or DENV3 caused a significant 4-fold increase in MIF concentrations in cell culture supernatants that peaked at 24 h after infection (Fig. 2A, Supplemental Fig. 2). A similar result was obtained when secretion of TNF- α and IL-6 by these cell cultures was analyzed (Fig. 2B, C). The results also showed that secretion of these cytokines requires a productive infection, because inactivated DENV was unable to induce it. Interestingly, the expression of MIF mRNA was marginally affected by infection, whereas a marked induction of TNF- α and IL-6 mRNAs synthesis could be observed as early as 14 h after infection (Fig. 2D–F). In addition, DENV infection induced PGE₂ production (Fig. 2G).

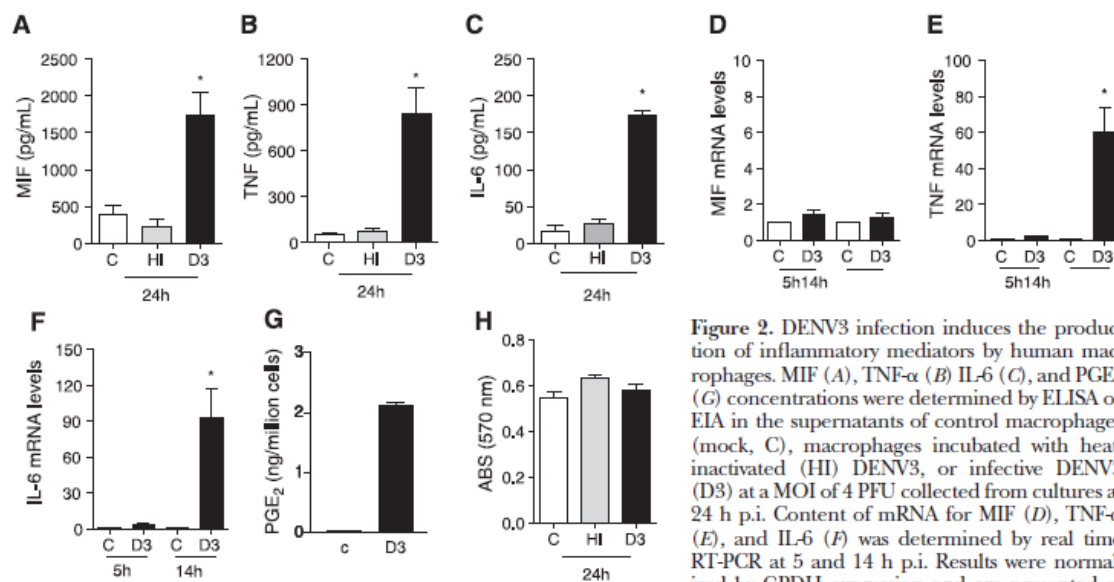
Although MIF release independent of gene transcription has been shown to occur concurrently with cell necrosis in influenza A virus-infected epithelial cells (45), this was not the case for MIF secretion by DENV-infected macrophages, because at 24 h p.i. viability was similar in both infected and noninfected cells (Fig. 2H). These results indicate that a productive virus infection was required to promote MIF secretion, probably from preformed stocks. Moreover, this effect was independent of cell death.

The liver is an important target for the DENV, and the

human hepatome cell line HepG2 has generally been used to characterize hepatocyte responses to infection (46–48). Thus, the putative involvement of hepatocytes in MIF production during DENV infection was evaluated using HepG2 cells. The *in vitro* infection of HepG2 with DENV3 caused a significant increase in MIF concentrations in the supernatants that peaked at 48 h p.i. (Supplemental Fig. 3). Again, inactivated virus was unable to induce MIF secretion, indicating that a productive infection is required to promote MIF secretion by hepatocytes. In addition, in these cells the transcription of MIF was barely affected by the infection, and no change in cell viability was observed at the time points analyzed (Supplemental Fig. 3). These data indicate that similar to macrophages, DENV infection in hepatocytes causes the secretion of preformed MIF irrespective of cell death.

In vitro blockade of MIF reduced production of inflammatory mediators during infection

To examine the involvement of MIF in macrophage activation on DENV infection, we used a MIF-neutralizing antibody and a selective antagonist of MIF action, ISO-1 (49). Both treatments did not affect viral replication, as analyzed by plaque assay and quantitative PCR (Fig. 3A, B). On the other hand, blockade of MIF inhibited the secretion of TNF- α and IL-6 and affected the mRNA expression of these cytokines (Fig. 3C, F). Inhibition of MIF also reduced the production of PGE₂ (Fig. 3G). These results suggest that MIF secretion induces an amplification of macrophage inflammatory response due to infection and may play an important role in the pathogenesis of DENV infection.



fold induction of mRNA expression relative to control samples. Cell viability at 24 h p.i. was analyzed using MTT assays (H). Results are presented as means \pm SE. * $P \leq 0.05$. Results are representative of ≥ 3 independent experiments.

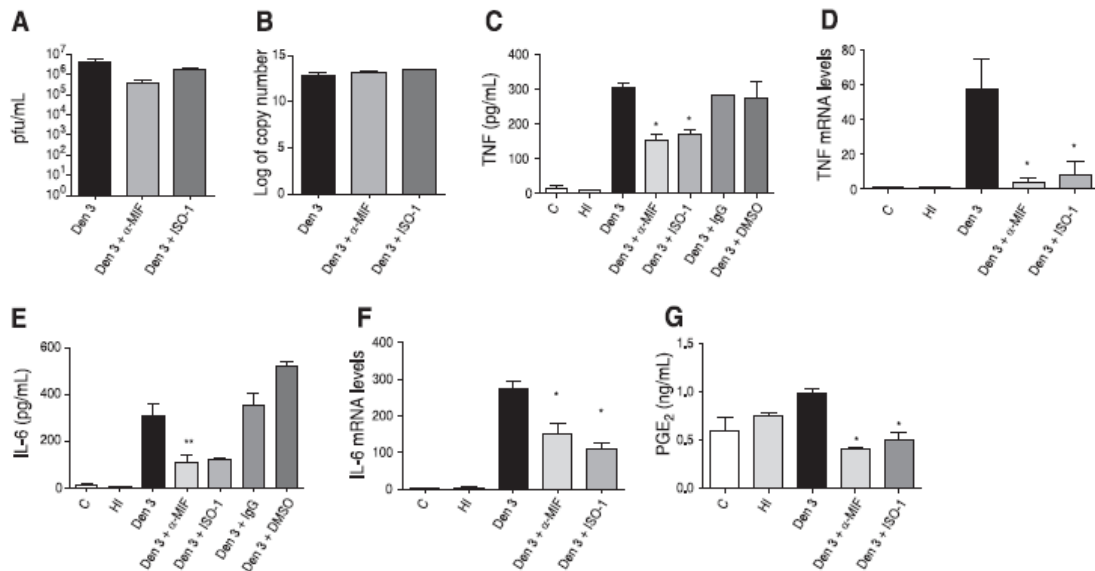


Figure 3. MIF contributes to the proinflammatory response during macrophage infection with DENV3. Production of infectious virions measured by plaque assay (A) and viral replication measured by real time RT-PCR (B) were determined in macrophages at 24 h p.i. TNF- α (C) and IL-6 (E) concentrations in the supernatants of macrophage cultures, at 24 h p.i. with DENV3 at a MOI of 4 PFU, were determined by ELISA, and PGE₂ (G) was quantified by EIA. Expression of mRNA for TNF- α (D) and IL-6 (F) was determined by real time RT-PCR in cellular extracts. Results of real time RT-PCR were normalized by GAPDH expression and are represented as fold induction of mRNA expression relative to control samples. Total goat IgG and DMSO alone (vehicle of ISO-1) were used as control for anti-hMIF and ISO-1 effects. Results are presented as means \pm SE. * $P \leq 0.05$. Results are representative of ≥ 2 independent experiments. C, control; HI, heat-inactivated.

Mif^{-/-} mice had delayed mortality and reduced viral load

A recent study demonstrated an important role for MIF in the pathogenesis of West Nile virus infection, affecting the survival and virus invasion of the central nervous system (34). Thus, to directly address whether MIF is involved in the pathogenesis of DENV infection, we used a DENV2 strain adapted to the mouse as an *in vivo* model of DHF (7, 8). In the absence of MIF, lethality was significantly delayed (Fig. 4A). In addition, *Mif*^{-/-}

mice had significantly lower viremia and viral load in the spleen at all time points analyzed compared with those in WT mice (Fig. 4B, C). These results suggest that MIF contributes to lethality and viral burden by increasing viral spreading or hampering viral control.

Reduced thrombocytopenia and inflammation in *Mif*^{-/-} mice

We have shown previously that infection of mice with this DENV strain causes hemoconcentration and a

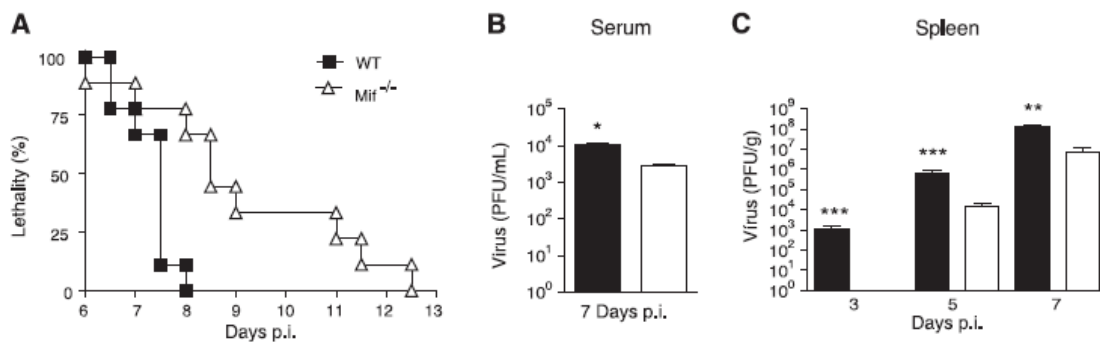


Figure 4. *Mif*^{-/-} mice had delayed mortality and reduced viral load after infection. A) *Mif*^{-/-} mice showed a delay in lethality after DENV2 infection compared with WT littermates; $n = 9$. B, C) *Mif*^{-/-} mice showed a reduction in viremia in serum 7 d after infection (B) and lower viremia in spleen on all days analyzed (C) compared with WT mice; $n = 9$. Results are presented as means \pm SE. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ vs. *Mif*^{-/-}.

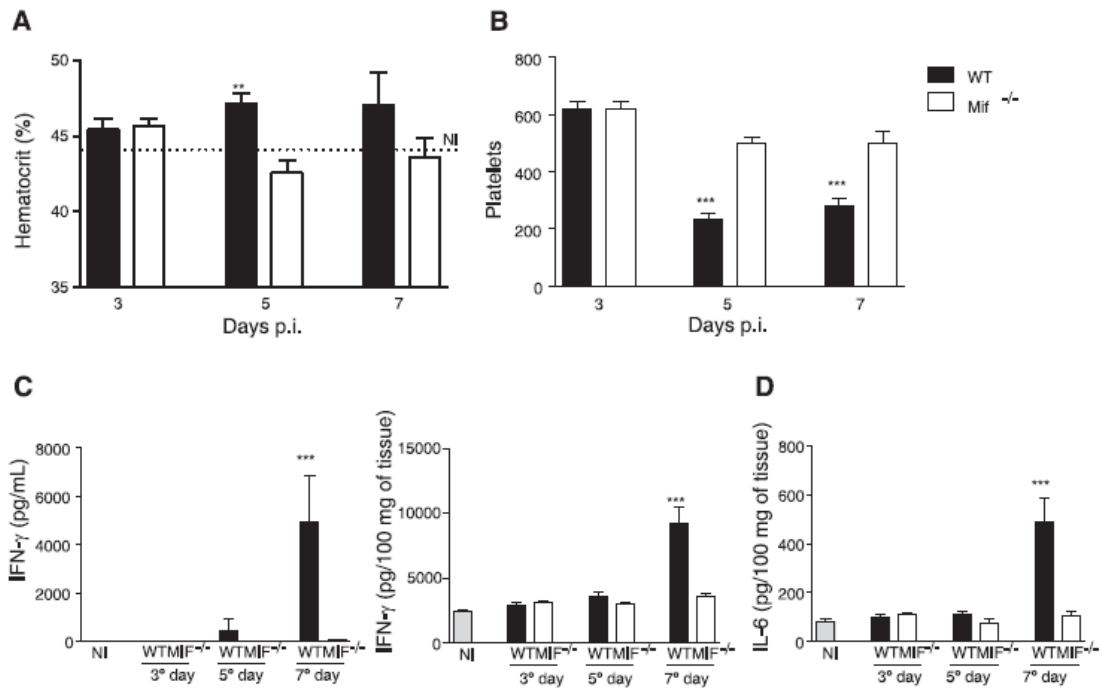


Figure 5. Reduced thrombocytopenia and inflammation in *Mif*^{-/-} mice. *A, B*) After DENV2 infection, *Mif*^{-/-} mice retained basal levels of hematocrit (*A*) and platelets (*B*) compared with noninfected mice, whereas WT mice showed hemoconcentration (*A*) and a substantial drop of platelets (*B*). *C*) After 7 d p.i., an increase of IFN- γ concentration was observed in WT mice in both serum and spleen, whereas *Mif*^{-/-} mice retained values at the basal level. *D*) Similarly, no increase in IL-6 production in spleen was detected in *Mif*^{-/-} mice compared with elevated concentrations 7 d p.i. in WT mice. NI, noninfected WT mice. Results are presented as means \pm SE; $n = 5$. *** $P \leq 0.01$; **** $P \leq 0.001$ vs. *Mif*^{-/-}.

marked thrombocytopenia, similar to that observed in patients with DHF (8). At 5 d p.i., WT animals presented hemoconcentration and a marked drop in platelet number, whereas *Mif*^{-/-} mice were protected from these abnormalities (Fig. 5*A, B*). Cytokine storm plays a critical role in sepsis and is likely to contribute to the severity of DHF (44, 50). Quantification of cytokines demonstrated that *Mif*^{-/-} mice had reduced concentrations of IFN- γ and IL-6 compared with those in WT infected animals (Fig. 5*C, D*). WT mice showed an

increase in the numbers of lung neutrophils as an inflammatory response to infection [as assessed by myeloperoxidase (MPO) activity], whereas in *Mif*^{-/-} mice the number remained similar to that of noninfected controls at 7 d p.i. (Fig. 6*A*). This increase in tissue neutrophils correlated with higher amounts of the neutrophil-attracting chemokines KC and MIP-2 in the lungs of WT mice at 7 d p.i. (Fig. 6*B, C*). Again, no such increase in the concentration of chemokines was observed in the lungs of *Mif*^{-/-} mice. Taken together,

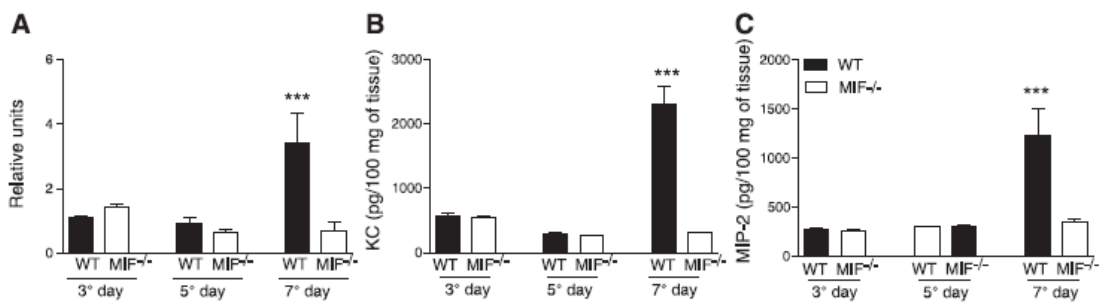


Figure 6. Lungs of *Mif*^{-/-} mice are protected by DENV2 infection. Neutrophils in the lungs were determined by MPO. *A*) In WT mice, there was a great neutrophil accumulation in the lungs 7 d p.i., whereas no increase in this parameter was seen in *Mif*^{-/-} mice. *B, C*) CXCL1 (KC) (*B*) and CXCL2 (MIP-2) (*C*) concentrations in lung tissue macerates were determined by ELISA. NI, noninfected WT mice. Results are presented as means \pm SE; $n = 5$. *** $P \leq 0.001$ vs. *Mif*^{-/-}.

these results indicate that MIF participates in the pathogenesis of DENV infection, affecting the survival, the coagulation system, and the inflammatory response in a mouse model of severe disease.

DISCUSSION

MIF is a cytokine involved in several aspects of inflammatory and immune responses, participating in the pathogenesis of autoimmune, allergic, and infectious diseases (18, 19). A recent study demonstrated increased plasma concentrations of MIF in patients with severe forms of dengue (15), but the cells involved in MIF production as well as the role of MIF in the pathogenesis of DENV infection have not been previously evaluated. In the present study, to shed light on the role of MIF in the pathogenesis of DENV infection, we combined data from patients with DENV3 infection collected during an epidemic in Brazil, *in vitro* infection of human macrophages and hepatocytes with DENV2 and DENV3, and an experimental mouse model of severe dengue. We showed that 1) patients with DHF had elevated plasma concentrations of MIF, which was stored in LDs accumulated in the leukocytes; 2) infected human macrophages and hepatocytes secreted MIF, which is involved in the production of other inflammatory cytokines; and 3) endogenous MIF contributed to the pathogenesis of experimental dengue infection.

As found for patients with DHF in a DENV2 outbreak in southern Taiwan in 2002 (15), we observed that MIF concentration was elevated in the plasma of patients with the severe form of DENV3 infection in the epidemics that occurred in Rio de Janeiro, Brazil, also in 2002. All patients included in our study had DHF as diagnosed by multiple criteria, including confirmation of DENV3 infection, hemodynamic instability, hemorrhagic phenomenon, reduction in platelet numbers, and dehydration/hemoconcentration. These patients also showed a significant increase in plasma concentrations of TNF- α , IL-6, and IFN- γ . We and others have previously shown a positive correlation of increased plasma concentrations of MIF with disease severity in patients with bacterial sepsis and with DENV infection (15, 28).

Leukocytes from patients with DHF had most of the MIF labeling located in cytoplasmic inclusions, compatible with LD localization. The compartmentalization of MIF to LDs was analyzed by immunocytochemistry using conditions of cell fixation and permeabilization that avoid dissolution of these organelles. The requirement of these conditions might have prevented others from identifying MIF in these structures. LDs, although in reduced number, are normally present in leukocytes and are increased in size and number on cell activation (41). In fact, leukocytes from patients with DHF showed a significant increase in LD number, similar to our previously described observation in leukocytes from septic patients (51). The *in vitro* infection of macro-

phages with DENV also caused an increase in numbers of LDs, together with an increase in MIF, TNF- α , IL-6, and PGE₂ secretion. Blockade of MIF inhibited production of these inflammatory mediators induced by DENV infection. Considering the involvement of LDs in eicosanoid production and the role of MIF in inducing PGE₂ synthesis and release (22, 26, 41), one could envisage that MIF localization within LDs might be important for lipid mediator production. Alternatively, the localization of MIF within LDs could be an intermediary step in MIF secretion pathway. However, no formal evidence for this hypothesis is presently available, and future studies will be required to define the functional relationship between MIF and LDs. It has been shown previously that MIF secretion requires the ABCA1 transporter (52), and, more recently, that p115, a Golgi-associated protein, associates with MIF and is involved in MIF secretion (53). Thus, it will be interesting to analyze whether these proteins colocalize with MIF at the LD.

Human macrophages and hepatocytes infected with DENV showed a significant increase in secretion of MIF, making these cells candidates to act as sources of proinflammatory cytokines during infection of patients with DENV. The secretion of MIF occurred without a significant change in its gene transcription or in cell viability, suggesting that infection triggers a signaling pathway that induces MIF release from preformed stocks. Previous studies have shown the production of MIF due to viral infection, although the mechanisms involved in each case seem to be particular (34, 45, 54–57). For example, infection of lung epithelial cells with influenza A virus does not induce MIF gene transcription but causes the release of preformed MIF probably dependent of necrotic cell death (45). On the other hand, infection of fibroblasts with human cytomegalovirus triggers an early and sustained induction of MIF mRNA and protein production, with subsequent MIF secretion (55, 57). Moreover, *in vivo* infection with West Nile virus or Japanese encephalitis virus, both flaviviruses, cause a significant increase in MIF mRNA in mouse brains (34, 54). Much like the results shown here, macrophage infection with Sindbis virus resulted in MIF secretion from intracellular stocks, without an increase in MIF gene expression or an effect on cell viability (58). Thus, the mechanisms of MIF production and secretion in general and those due to viral infection in particular clearly require further investigation.

MIF secretion during DENV infection followed a pattern different from that of TNF- α and IL-6, whose production was clearly induced on the transcriptional level. Blockade of MIF reduced the production of these inflammatory mediators without affecting viral replication in macrophages. The sharp reduction in the production of TNF- α and IL-6 on blockage of MIF indicates that secreted MIF acts in an autocrine/paracrine fashion, regulating the production of these cytokines at the transcriptional level. Thus, MIF secreted on DENV infection induces the production of inflammatory mediators. These results suggest that MIF secretion

precedes the amplification of the inflammatory response observed in severe cases of dengue and point to MIF blockade as a strategy for a therapeutic approach to DENV infection.

To investigate the role of MIF in the pathogenesis of dengue, we used an experimental model of severe DENV infection characterized by increased vascular permeability, altered number and function of leukocytes, increased hematocrit, thrombocytopenia, and varying degrees of hemorrhage (8). *Mif*^{-/-} mice had a significant delay in lethality and reduction in all parameters of severity on DENV infection compared with WT mice, reinforcing the role of MIF in the pathogenesis of dengue. The mild pathological condition of *Mif*^{-/-} mice might reflect both the reduced viral load observed in the initial days and the lower production of inflammatory mediators. The reduction of viral load could be related to the better hemodynamic status of *Mif*^{-/-} mice, thus facilitating leukocyte circulation. At later time points, however, the viremia became similar to that of the WT mice, and eventually *Mif*^{-/-} mice died. Previous studies demonstrated that MIF blockade had no effect on hepatitis B virus control but reduced liver injury (33). Similarly, abrogation of MIF reduced the cerebral pathogenesis in a model of West Nile virus infection without affecting the capacity to control the virus in the periphery (33). Lack of MIF benefits the clearance of certain bacterial infections but impairs the control of protozoan parasites and *Salmonella typhimurium* bacterial infection (31, 35, 59). Thus, as shown by the results of *in vitro* studies of MIF production and secretion during infection, the role of MIF in the pathogenesis of different infection seems to be specific to each case.

We observed a striking reduction in the concentrations of cytokines in infected *Mif*^{-/-} mice compared with those observed in WT animals. A central role for MIF in tuning the production of cytokines is a common feature in many inflammatory and infectious models and is considered important to the reduced pathogenesis observed when MIF is absent by genetic manipulation, neutralizing antibody, or drug treatment (21, 30, 49, 60, 61). Also, in consideration of the role of cytokines on coagulation and hemodynamic abnormalities found in dengue, it is conceivable that the reduced production of cytokines observed in *Mif*^{-/-} mice might have been beneficial (7, 44). In fact, we recently observed a positive correlation between IFN- γ concentrations and disease severity in patients with dengue (14). Finally, neutrophil recruitment to the lungs was impaired in *Mif*^{-/-} mice compared with that in WT mice, and this was associated with reduced production of the chemoattractants KC and MIP-2. The involvement of MIF in neutrophil recruitment in the DENV infection is likely to comprise multifactorial effects. In fact, besides induction of chemoattractants, these factors could include controlling the expression of adhesion molecules, because MIF has been shown to modulate intercellular adhesion molecule and vascular cell adhesion molecule expression on endothelial cells and chemokine production (20, 62). In addition,

MIF may act directly as a chemoattractant for granulocytes (25, 36).

In conclusion, we presented evidence for significant involvement of MIF in the response to DENV infection and its pathogenesis. These results suggest that blockade of MIF might constitute an adjunctive therapeutic approach in severe cases of dengue. [7]

This work was supported by Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ; Brazil), and National Institute of Science and Technology in Dengue (INCT-Dengue; Brazil).

REFERENCES

- Gibbons, R. V., and Vaughn, D. W. (2002) Dengue: an escalating problem. *BMJ* **324**, 1563–1566
- Guzman, M. G., and Kouri, G. (2002) Dengue: an update. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 33–42
- Mackenzie, J. S., Gubler, D. J., and Petersen, L. R. (2004) Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.* **10**, S98–S109
- Guzman, M. G., and Kouri, G. (2008) Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987–2007. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **102**, 522–523
- World Health Organization. (2002) Dengue and dengue hemorrhagic fever. Fact sheet 117/2002. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>
- Pan American Health Organization. (2007) Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), region of the Americas. <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2007.htm>
- Atrasheuskaya, A., Petzelbauer, P., Fredeking, T. M., and Ignatyev, G. (2003) Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**, 33–42
- Souza, D. G., Fagundes, C. T., Sousa, L. P., Amaral, F. A., Souza, R. S., Souza, A. L., Kroon, E. G., Sachs, D., Cunha, F. Q., Bukin, E., Atrasheuskaya, A., Ignatyev, G., and Teixeira, M. M. (2009) Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14138–14143
- Hober, D., Poli, L., Roblin, B., Gestas, P., Chungue, E., Granic, G., Imbert, P., Pecarere, J. L., Vergez-Pascal, R., Wattre, P., and Maniez-Montreuil, M. (1993) Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β) in dengue-infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**, 324–331
- Braga, E. L., Moura, P., Pinto, L. M., Ignacio, S. R., Oliveira, M. J., Cordeiro, M. T., and Kubelka, C. F. (2001) Detection of circulating tumor necrosis factor- α , soluble tumor necrosis factor p75 and interferon- γ in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**, 229–232
- Suharti, C., van Gorp, E. C., Setiati, T. E., Dolmans, W. M., Djokomoeljanto, R. J., Hack, C. E., ten Cate, H., and van der Meer, J. W. (2002) The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb. Haemost.* **87**, 42–46
- Bosch, I., Khaja, K., Estevez, L., Raines, G., Melichar, H., Warke, R. V., Fournier, M. V., Ennis, F. A., and Rothman, A. L. (2002) Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J. Virol.* **76**, 5588–5597
- Green, S., and Rothman, A. L. (2006) Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**, 429–436
- Bozza, F. A., Cruz, O. G., Zagne, S. M., Azeredo, E. L., Nogueira, R. M., Assis, E. F., Bozza, P. T., and Kubelka, C. F. (2008) Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1 β and IFN- γ as predictive factors for severity. *BMC Infect. Dis.* **8**, 86–97

15. Chen, L. C., Lei, H. Y., Liu, C. C., Shiesh, S. C., Chen, S. H., Liu, H. S., Lin, Y. S., Wang, S. T., Shyu, H. W., and Yeh, T. M. (2006) Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 142–147
16. Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R. A., Martin, S. B., Tracey, K. J., Voelter, W., Manogue, K. R., Cerami, A., and Bucala, R. (1993) MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* **365**, 756–759
17. Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C. N., Spiegel, L. A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A., and Bucala, R. (1995) MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* **377**, 68–71
18. Calandra, T., and Roger, T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 791–800
19. Leng, L., and Bucala, R. (2005) Macrophage migration inhibitory factor. *Crit. Care Med.* **33**, S475–477
20. Paiva, C. N., Arras, R. H., Magalhães, E. S., Alves, L. S., Lessa, L. P., Silva, M. H., Ejzemberg, R., Canetti, C., and Bozza, M. T. (2009) Migration inhibitory factor (MIF) released by macrophages upon recognition of immune complexes is critical to inflammation in Arthus reaction. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 855–861
21. Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A., Gerard, C., and David, J. R. (1999) Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J. Exp. Med.* **189**, 341–346
22. Mitchell, R. A., Metz, C. N., Peng, T., and Bucala, R. (1999) Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF): regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J. Biol. Chem.* **274**, 18100–18106
23. Roger, T., David, J., Glauser, M. P., and Calandra, T. (2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* **414**, 920–924
24. Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J., and Bucala, R. (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 345–350
25. Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J. L., Zerneck, A., Koenen, R. R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S. R., Bucala, R., Hickey, M. J., and Weber, C. (2007) MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.* **13**, 587–596
26. Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R. A., and Bucala, R. (2003) MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* **197**, 1467–1476
27. Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., McDonald, C., Chen, Z., Murphy, J. W., Lolis, E., Noble, P., Knudson, W., and Bucala, R. (2006) CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* **25**, 595–606
28. Bozza, F. A., Gomes, R. N., Japiassú, A. M., Soares, M., Castro-Faria-Neto, H. C., Bozza, P. T., and Bozza, M. T. (2004) Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock* **22**, 309–313
29. Sprong, T., Pickkers, P., Geurts-Moespot, A., van der Ven-Jongekrijg, J., Neeleman, C., Knaup, M., Leroy, D., Calandra, T., van der Meer, J. W., Sweep, F., and van Deuren, M. (2007) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in meningococcal septic shock and experimental human endotoxaemia. *Shock* **27**, 482–487
30. Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D. L., Pugin, J., Metz, C. N., Hültner, L., Heumann, D., Männel, D., Bucala, R., and Glauser, M. P. (2000) Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat. Med.* **6**, 164–170
31. Satoskar, A. R., Bozza, M., Rodriguez Sosa, M., Lin, G., and David, J. R. (2001) Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect. Immun.* **69**, 906–911
32. McDevitt, M. A., Xie, J., Shanmugasundaram, G., Griffith, J., Liu, A., McDonald, C., Thuma, P., Gordeuk, V. R., Metz, C. N., Mitchell, R., Keefer, J., David, J., Leng, L., and Bucala, R. (2006) A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *J. Exp. Med.* **203**, 1185–1196
33. Kimura, K., Nagaki, M., Nishihira, J., Satake, S., Kuwata, K., and Moriwaki, H. (2006) Role of macrophage migration inhibitory factor in hepatitis B virus-specific cytotoxic-T-lymphocyte-induced liver injury. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 415–419
34. Arjona, A., Foellmer, H. G., Town, T., Leng, L., McDonald, C., Wang, T., Wong, S. J., Montgomery, R. R., Fikrig, E., and Bucala, R. (2007) Abrogation of macrophage migration inhibitory factor decreases West Nile virus lethality by limiting viral neuroinvasion. *J. Clin. Invest.* **117**, 3059–3066
35. Flores, M., Saavedra, R., Bautista, R., Viedma, R., Tenorio, E. P., Leng, L., Sánchez, Y., Juárez, I., Satoskar, A. A., Shenoy, A. S., Terrazas, L. I., Bucala, R., Barbi, J., Satoskar, A. R., and Rodriguez-Sosa, M. (2008) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB J.* **22**, 3661–3671
36. Magalhães, E. S., Paiva, C. N., Souza, H. S., Pyrrho, A. S., Mourão-Sá, D., Figueiredo, R. T., Vieira-de-Abreu, A., Dutra, H. S., Silveira, M. S., Gaspar-Elsas, M. L., Xavier-Elsas, P., Bozza, P. T., and Bozza, M. T. (2009) Macrophage migration inhibitory factor is critical to interleukin-5-driven eosinophilopoiesis and tissue eosinophilia triggered by *Schistosoma mansoni* infection. *FASEB J.* **23**, 1262–1271
37. Souza, D. G., Soares, A. C., Pinho, V., Torloni, H., Reis, L. F., Teixeira, M. M., Dias, A. A., and Martins, M. T. (2002) Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. *Am. J. Pathol.* **160**, 1755–1765
38. Bozza, F. A., Salluh, J. I., Japiassu, A. M., Soares, M., Assis, E. F., Gomes, R. N., Bozza, M. T., Castro-Faria-Neto, H. C., and Bozza, P. T. (2007) Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit. Care* **11**, R49–R56
39. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *Methods* **25**, 402–408
40. Zhang, W., Yue, B., Wang, G. Q., and Lu, S. L. (2002) Serum and ascites levels of macrophage migration inhibitory factor, TNF- α and IL-6 in patients with chronic virus hepatitis B and hepatitis cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **1**, 577–580
41. Bozza, P. T., Magalhaes, K. G., and Weller, P. F. (2009) Leukocyte lipid bodies—biogenesis and functions in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 40–51
42. Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A., and Bucala, R. (1994) The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* **179**, 1895–1902
43. Chen, Y. C., and Wang, S. Y. (2002) Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J. Virol.* **76**, 9877–9887
44. Chen, S. T., Lin, Y. L., Huang, M. T., Wu, M. F., Cheng, S. C., Lei, H. Y., Lee, C. K., Chiou, T. W., Wong, C. H., and Hsieh, S. L. (2008) CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* **453**, 672–676
45. Arndt, U., Wennemuth, G., Barth, P., Nain, M., Al-Abed, Y., Meinhardt, A., Gemsa, D., and Bacher, M. (2002) Release of macrophage migration inhibitory factor and CXCL8/interleukin-8 from lung epithelial cells rendered necrotic by influenza A virus infection. *J. Virol.* **76**, 9298–9306
46. El-Bacha, T., Midlej, V., Pereira da Silva, A. P., Silva da Costa, L., Benchimol, M., Galina, A., and Da Poian, A. T. (2007) Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 1158–1166
47. Higa, L. M., Caruso, M. B., Canellas, F., Soares, M. R., Oliveira-Carvalho, A. L., Chapeaurouge, D. A., Almeida, P. M., Perales, J., Zingali, R. B., and Da Poian, A. T. (2008) Secretome of HepG2 cells infected with dengue virus: implications for pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 1607–1616
48. Umareddy, I., Tang, K. F., Vasudevan, S. G., Devi, S., Hibberd, M. L., and Gu, F. (2008) Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines. *J. Gen. Virol.* **89**, 3052–3062
49. Lubetsky, J. B., Dios, A., Han, J., Aljabari, B., Ruzsicska, B., Mitchell, R., Lolis, E., and Al-Abed, Y. (2002) The tautomerase

- active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J. Biol. Chem.* **277**, 24976–24982
50. Pang, T., Cardoso, M. J., and Guzman, M. G. (2007) Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol. Cell Biol.* **85**, 43–45
 51. Pacheco, P., Bozza, F. A., Gomes, R. N., Bozza, M., Weller, P. F., Castro-Faria-Neto, H. C., and Bozza, P. T. (2002) Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. *J. Immunol.* **169**, 6498–6506
 52. Flieger, O., Engling, A., Bucala, R., Lue, H., Nickel, W., and Bernhagen, J. (2003) Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett.* **551**, 78–86
 53. Merk, M., Baugh, J., Zierow, S., Leng, L., Pal, U., Lee, S. J., Ebert, A. D., Mizue, Y., Trent, J. O., Mitchell, R., Nickel, W., Kavathas, P. B., Bernhagen, J., and Bucala, R. (2009) The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor. *J. Immunol.* **182**, 6896–6906
 54. Suzuki, T., Ogata, A., Tashiro, K., Nagashima, K., Tamura, M., Yasui, K., and Nishihira, J. (2000) Japanese encephalitis virus up-regulates expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA in the mouse brain. *Biochim. Biophys. Acta* **1517**, 100–106
 55. Bacher, M., Eickmann, M., Schrader, J., Gemsa, D., and Heiske, A. (2002) Human cytomegalovirus-mediated induction of MIF in fibroblasts. *Virology* **299**, 32–37
 56. Armstrong, M. E., Cantier, M., Li, L., Chung, W. Y., McCann, A., Baugh, J. A., and Donnelly, S. C. (2008) Small interfering RNAs induce macrophage migration inhibitory factor production and proliferation in breast cancer cells via a double-stranded RNA-dependent protein kinase-dependent mechanism. *J. Immunol.* **180**, 7125–7133
 57. Frascaroli, G., Varani, S., Blankenhorn, N., Pretsch, R., Bacher, M., Leng, L., Bucala, R., Landini, M. P., and Mertens, T. (2009) Human cytomegalovirus paralyzes macrophage motility through down-regulation of chemokine receptors, reorganization of the cytoskeleton, and release of macrophage migration inhibitory factor. *J. Immunol.* **182**, 477–488
 58. Assunção-Miranda, I., Bozza, M. T., and Da Poian, A. (2009) Pro-inflammatory response resulting from Sindbis virus infection of human macrophages: Implications for the pathogenesis of viral arthritis. *J. Med. Virol.* **82**, 164–174
 59. Koebernick, H., Grode, L., David, J. R., Rohde, W., Rolph, M. S., Mitrücker, H. W., and Kaufmann, S. H. (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13681–13686
 60. Mizue, Y., Ghani, S., Leng, L., McDonald, C., Kong, P., Baugh, J., Lane, S. J., Craft, J., Nishihira, J., Donnelly, S. C., Zhu, Z., and Bucala, R. (2005) Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 14410–14415
 61. Magalhães, E. S., Mourao-Sa, D. S., Vieira-de-Abreu, A., Figueiredo, R. T., Pires, A. L., Farias-Filho, F. A., Fonseca, B. P., Viola, J. P., Metz, C., Martins, M. A., Castro-Faria-Neto, H. C., Bozza, P. T., and Bozza, M. T. (2007) Macrophage migration inhibitory factor is essential for allergic asthma but not for Th2 differentiation. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1097–1106
 62. Amin, M. A., Haas, C. S., Zhu, K., Mansfield, P. J., Kim, M. J., Lackowski, N. P., and Koch, A. E. (2006) Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFκB. *Blood* **107**, 2252–2261

Received for publication June 22, 2009.
Accepted for publication August 27, 2009.