

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES**  
**Mestrado Acadêmico em Saúde Pública**

**Mayara Marques Carneiro da Silva**

**IMUNIDADE INATA AO VÍRUS DA DENGUE: UM ESTUDO DO INTERFERON  
DO TIPO I**

**RECIFE**

**2013**

**MAYARA MARQUES CARNEIRO DA SILVA**

**IMUNIDADE INATA AO VÍRUS DA DENGUE: UM ESTUDO DO INTERFERON  
DO TIPO I**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil, PhD

Co - Orientador: Renato Antônio dos Santos Oliveira, PhD

RECIFE

2013

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

S586i Silva, Mayara Marques Carneiro.

Imunidade inata ao vírus da dengue: um estudo do interferon do tipo I / Mayara Marques Carneiro Silva. - Recife: s.n, 2013.

69 p. : ilus., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzáles Gil;  
co-orientador: Renato Antônio dos Santos Oliveira.

1. Interferon tipo I. 2. Vírus da Dengue - imunologia. 3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 4. Ensaio de imunoabsorção imunoenzimática. I. Gil, Laura Helena Vega Gonzáles. II. Oliveira, Renato Antônio dos Santos. III. Título.

CDU 578

---

**MAYARA MARQUES CARNEIRO DA SILVA**

**IMUNIDADE INATA AO VÍRUS DA DENGUE: UM ESTUDO DO INTERFERON  
DO TIPO I**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovada em: 15 / 04 / 2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

PhD Laura Helena Vega Gonzales Gil  
CPqAM/Fiocruz

---

PhD Renato Antônio dos Santos Oliveira  
CPqAM/Fiocruz

---

PhD Valéria Rêgo Alves Pereira  
CPqAM/Fiocruz

---

PhD Giovani Rota Bertani  
UFPE

*Dedico este trabalho a minha família, amigos e a todos os outros que, de alguma forma, me ajudaram a finalizá-lo.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar e me dar forças.

A minha família, meus pais, Claudio e Gizelda, por estarem sempre me proporcionando todas as condições necessárias para conquistar meus objetivos e me estimulando a seguir em frente e nunca desistir; e meu irmão, Claudinho, pelas caronas para a faculdade, paciência e amizade.

A minha orientadora, Dra. Laura Gil, e ao meu co-orientador, Dr. Renato Oliveira, pelo apoio, dedicação, confiança, e paciência a mim dedicados. Por acreditarem no meu potencial e por toda ajuda no desenvolvimento desse projeto.

Ao Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva e a Dra. Ana Lisa do Vale Gomes, por me conduzirem no meu primeiro ano de iniciação científica, pelo apoio e ensinamentos a mim dedicados.

A todos que fazem parte do LaViTE, pela amizade, conversas, dicas e incentivos nos meus momentos de desespero. Em especial aos meus amigos de bancada. Aos que já não estão trabalhando conosco, mas muito queridos, Jefferson, Rangel, Sabrina, Sandra, Isabelle, Klécia, Gabriel, Andrea Melo, Renato e aos sempre presentes: Amanda, pelo tempo e por todos os ensinamentos a mim concedidos; Verônica, por ter separado todas as amostras que precisei utilizar para desenvolver este trabalho e pela alegria sempre contagiante; Diégina, pelos fluxos sempre limpinhos logo cedo da manhã; Clintiano, por está sempre disposto a resolver os problemas; Geo, companheira de ultracentrifugação, que fez muita falta quando foi para o EUA; José Valter, pela ajuda de sempre, pelo “carinho” e apelidos dados a mim; Kennya, pelos sábios conselhos; Telissa, por dividir comigo todos os momentos de desespero, principalmente nas disciplinas VM; Laís, pelos tantos momentos de risadas; e André, por está sempre por perto. Finalmente, a todos pela amizade verdadeira que eu espero que se perpetue apesar da distância.

Aos amigos da turma do mestrado e a todos os outros que estiveram envolvidos, direta ou indiretamente, com o desenvolvimento desse projeto.

SILVA, Mayara Marques Carneiro. **Imunidade inata ao vírus da dengue: um estudo do interferon do tipo I.** 2013. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

## RESUMO

A febre da dengue (FD) e a febre hemorrágica da dengue (FHD) têm emergido como as mais importantes doenças causadas por arbovírus em áreas tropicais. A forma mais grave da doença, a FHD, apresenta taxa de mortalidade geralmente entre 1% e 10% e requer hospitalização e um cuidadoso controle hemodinâmico dos pacientes. O interferon do tipo I (IFN-I), IFN- $\alpha/\beta$ , juntamente com o IFN tipo do II (IFN-II), IFN- $\gamma$ , são fundamentais na mediação da resposta antiviral, através da modulação da resposta imune para inibir a propagação viral. No presente trabalho, propomos o estudo da resposta imune inata ao vírus da dengue (DENV), com ênfase no IFN-I. Para isso, investigamos os níveis de expressão dos genes que codificam os IFN-I e IFN-II, utilizando cDNA, obtido de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes infectados com o DENV, através do sistema de PCR em tempo real (qPCR), e analisamos os níveis de IFN-I no soro dos mesmos pacientes pelo ELISA. Avaliamos, também, a via de sinalização do IFN-I em células infectadas por diferentes cepas do DENV, utilizando a linhagem celular BHK21pISRELucHygro, que possui em seu genoma um plasmídeo que contém como promotor o ISRE (região responsiva ao IFN-I) fusionado ao gene repórter luciferase. A quantificação do IFN-I das PBMCs, por qPCR, mostrou que os pacientes acometidos com a FHD, com até 5 dias de febre, expressaram níveis mais elevados do IFN-I quando comparados aos pacientes acometidos pela FD. Enquanto, os níveis séricos de IFN- $\alpha$  dos pacientes FD e FHD, quantificados através do ELISA, mostraram níveis similares, representando um padrão diferente do observado nos transcritos de IFN-I em PBMCs. No entanto, os níveis séricos de IFN- $\beta$  foram significativamente maiores em pacientes FHD, confirmando o padrão observado na quantificação por qPCR. Por fim, na análise da via de sinalização do IFN-I via expressão da luciferase em células BHK21pISRELucHygro após infecção por diferentes cepas do DENV foi observado que esses isolados clínicos possuíram a capacidade de inibir a via em diferentes proporções.

Palavras-chaves: Interferon tipo I; Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; Ensaio de imunoadsorção imunoenzimática.

SILVA, Mayara Marques Carneiro. **Innate immunity to dengue virus: a study of the type I interferon.** 2013. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

## ABSTRACT

Dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF) have emerged as the most important diseases caused by arboviruses in tropical areas. The most severe form of the disease, DHF, shows the mortality rate typically between 1% and 10%, requires hospitalization and careful hemodynamic patients control. The type I interferon (IFN-I), IFN  $\alpha/\beta$ , together with the type II IFN (IFN-II), IFN  $\gamma$ , are critical in mediating the antiviral response by modulating the immune response to inhibit viral propagation. In the present work we propose to study the innate immune response to dengue virus (DENV), with emphasis on IFN-I. Thus, we investigated the expression levels of genes encoding the IFN-I and IFN-II using cDNA obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients infected with DENV, through the real-time PCR (qPCR) and also analyzed the levels of IFN-I in serum of the same patients by ELISA (Enzyme-Linked Assay Immunoabsorbent). Furthermore, we evaluated the signaling pathway of IFN-I in cells infected with different strains of DENV isolated, using a cell line BHK-21-pISRE-Luc-Hygro, which has in its genome the plasmid pISRE-Luc-Hygro, which is the ISRE promoter (the responsive region to IFN-I) fused to the luciferase reporter gene. Quantitation of IFN-I of PBMC by qPCR, showed that patients with DHF, with up to five days of fever, expressed higher levels of IFN-I when compared to patients affected by DF. Meanwhile, serum levels of IFN- $\alpha$  on DF and DHF patients, quantified by ELISA, showed similar levels, representing a pattern different from that observed in IFN-I transcripts in PBMC. However, IFN- $\beta$  serum levels were significantly higher in DHF patients, confirming the pattern observed for the qPCR. Finally, analysis of the IFN-I signaling pathway via luciferase expression after infection of BHK-21-pISRE-Luc-Hygro by different strains of DENV showed that these clinical isolates possessed the ability to inhibit the IFN-I signaling pathway in different proportions.

Keywords: Interferon Type I; Real-Time Polymerase Chain Reaction; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Distribuição geográfica dos casos de dengue.  | 11 |
| <b>Figura 2</b>  | Municípios infestados pelo <i>A. aegypti</i> em 1995 e 2010.  | 13 |
| <b>Figura 3</b>  | Sorotipos circulantes, Brasil, 2012.  | 14 |
| <b>Figura 4</b>  | Vetor do DENV, o culicídeo <i>A. aegypti</i> .  | 19 |
| <b>Figura 5</b>  | Indução, sinalização e ação do IFN tipo I.  | 27 |
| <b>Figura 6</b>  | Inibição da via de sinalização do IFN-I pelo DENV.  | 30 |
| <b>Figura 7</b>  | PCR em tempo real baseada no sistema TaqMan®.   | 32 |
| <b>Figura 8</b>  | Principais tipos de ELISA.  | 34 |
| <b>Figura 9</b>  | Esquema de expressão da luciferase por ativação do promotor ISRE estimulado por IFN-I.  | 37 |
| <b>Gráfico 1</b> | Determinação dos níveis de transcritos do IFNs medidos por RT-PCR usando PBMC de pacientes infectados pelo DENV.  | 48 |
| <b>Gráfico 2</b> | Níveis séricos do IFN-I em pacientes na fase aguda da infecção pelo dengue.   | 49 |
| <b>Gráfico 3</b> | Atividade da luciferase em células da linhagem BHK-21-pISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas de três sorotipos do DENV e tratadas, durante 8 horas, com 2000 UI/mL de IFN- $\alpha$ , em relação ao controle negativo. | 51 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>   | <b>11</b> |
| <i>1.1 Aspectos epidemiológicos e histórico da dengue</i>     | <b>11</b> |
| <i>1.2 Vírus dengue</i>                                       | <b>15</b> |
| <i>1.3 Modo de transmissão</i>                                | <b>18</b> |
| <i>1.4 Formas clínicas</i>                                    | <b>20</b> |
| 1.4.1 Imunopatologia da FHD                                   | <b>21</b> |
| <i>1.5 Controle e tratamento</i>                              | <b>23</b> |
| <i>1.6 Resposta imune a infecção viral</i>                    | <b>24</b> |
| 1.6.1 Sistema imune inato – resposta via IFN                  | <b>25</b> |
| 1.6.2 Resposta da via IFN-I na infecção pelo DENV             | <b>28</b> |
| <i>1.7 PCR quantitativa em tempo real</i>                     | <b>31</b> |
| 1.7.1 Controles da reação                                     | <b>32</b> |
| 1.7.2 Quantificação relativa                                  | <b>33</b> |
| <i>1.8 Ensaio imunoenzimático</i>                             | <b>34</b> |
| <i>1.9 Sistemas de gene repórter</i>                          | <b>35</b> |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b>  | <b>38</b> |
| <b>3 PERGUNTA CONDUTORA</b>                                   | <b>39</b> |
| <b>4 OBJETIVOS</b>  | <b>40</b> |
| <i>4.1 Objetivo Geral</i>                                     | <b>40</b> |
| <i>4.2 Objetivos Específicos</i>                              | <b>40</b> |
| <b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                  | <b>41</b> |
| <i>5.1 Seleção das amostras</i>                               | <b>41</b> |
| <i>5.2 Preparo das amostras celulares</i>                     | <b>42</b> |
| <i>5.3 Purificação de RNA total de PBMC</i>                   | <b>42</b> |
| <i>5.4 RT-PCR</i>   | <b>43</b> |
| <i>5.5 PCR quantitativa em tempo real</i>                     | <b>43</b> |
| <i>5.6 Preparo das amostras sorológicas</i>                   | <b>43</b> |
| <i>5.7 Determinação dos níveis séricos do IFN-I por ELISA</i> | <b>44</b> |
| <i>5.8 Análises estatísticas</i>                              | <b>44</b> |
| <i>5.9 Cultivo de células</i>                                 | <b>45</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5.10 Cultivo de vírus</b>   | <b>45</b> |
| 5.10.1 Concentração viral  | 45        |
| 5.10.2 Titulação viral   | 46        |
| <b>5.11 Estudo da via de sinalização do IFN-I em células infectadas com diferentes cepas isoladas do DENV</b>              | <b>47</b> |
| <b>5.12 Considerações éticas</b>   | <b>47</b> |
| <b>6 RESULTADOS</b>  | <b>48</b> |
| <b>6.1 Quantificação da expressão dos genes IFN <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> e <math>\gamma</math> por Qpcr</b> | <b>48</b> |
| <b>6.2 Determinação dos níveis séricos do IFN-I por ELISA</b>  | <b>49</b> |
| <b>6.3 Estudo da via de sinalização do IFN-I em células infectadas com diferentes cepas isoladas do DENV</b>               | <b>50</b> |
| <b>7 DISCUSSÃO</b>   | <b>52</b> |
| <b>8 CONCLUSÕES</b>  | <b>57</b> |
| <b>9 PERSPECTIVAS</b>  | <b>58</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>59</b> |
| <b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA</b>  | <b>69</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos epidemiológicos e histórico da dengue

A infecção causada pelo vírus da dengue (DENV) é uma das mais importantes doenças transmitidas por mosquitos do mundo (MALAVIGE *et al.*, 2004). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) durante os últimos 50 anos, a incidência da dengue aumentou 30 vezes e avalia-se que 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas espalhadas por mais de 100 países (Figura 1) (COFFEY *et al.*, 2009). Estima-se que anualmente ocorram mais de 500 milhões de infecções, sendo pelo menos 500 mil da forma grave da doença e 2.000 óbitos, principalmente em crianças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

**Figura 1** - Distribuição geográfica dos casos de dengue.



Fonte: Adaptada de Organização Mundial de Saúde (2009).

Nota: Em amarelo estão os países ou áreas onde houve registros de casos de dengue. As linhas grossas indicam as áreas potenciais de reprodução do mosquito transmissor devido às temperaturas atuais.

Embora os primeiros relatos de grandes epidemias de uma doença semelhante à dengue tenham ocorrido em três continentes (Ásia, África e América do Norte) em 1779 e 1780, há relatos de que doenças clinicamente compatíveis com a dengue ocorreram ainda mais cedo (GUBLER, 1997). O registro mais antigo encontrado até hoje foi documentado na enciclopédia chinesa publicada durante a dinastia Chin (265 a 420 d.C.) (GUBLER;

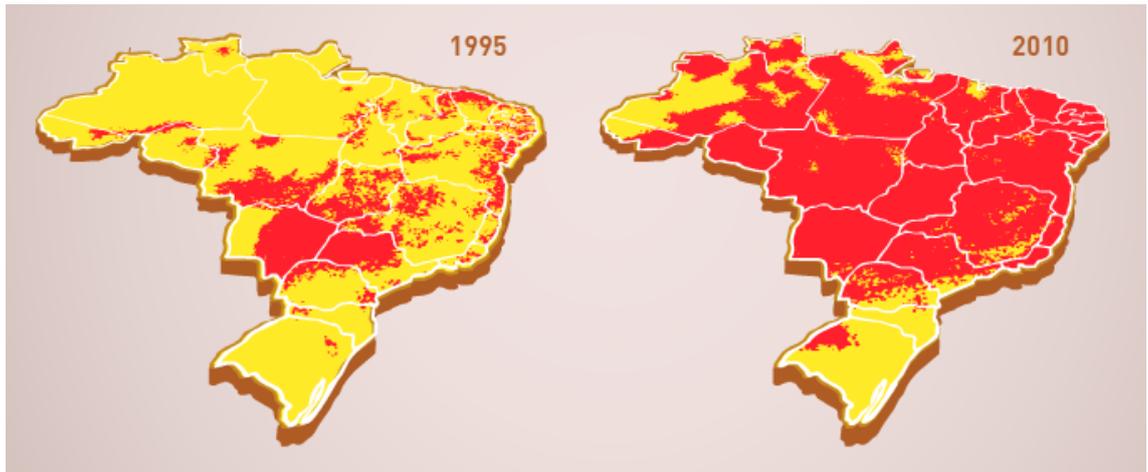
MELTZER, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 1999). Até a Segunda Guerra Mundial, as pandemias de dengue aconteciam a cada 10-30 anos e não era freqüente a ocorrência de epidemia em uma mesma localidade (GUBLER, 1998; RIGAU-PÉREZ *et al.*, 1998). Após a segunda Guerra Mundial a dengue passou a alastrar-se mundialmente, em áreas tropicais e subtropicais, sendo considerada uma das mais importantes doenças re-emergentes (YAMADA *et al.*, 2002).

Os sorotipos 1 e 2 co-circulam nas Américas há anos e depois de uma ausência de 17 anos (1994), o sorotipo 3 seguido pelo 4 (1998) começaram a ser isolados em todos os países da América Central. Depois de isolado o DENV1 em Cuba, no ano de 1977, duas epidemias ocorreram na ilha (1981 e 1997) causadas pelo sorotipo DENV2 que filogeneticamente era muito próximo da cepa DENV2 do sudoeste da Ásia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

A transmissão do DENV nas Américas foi interrompida devido a campanhas de erradicação do mosquito vetor na região, nas décadas de 1960 e 1970. No entanto, fatores como descontinuidade nas campanhas de erradicação e capacidade de sobrevivência do vetor favoreceram para que novos surtos se restabelecessem. Desde então tem acontecido surtos epidêmicos da doença a cada 3 – 5 anos, tendo o maior deles acontecido em 2002 com mais de 1 milhão de casos reportados nas Américas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

As áreas urbanas do Brasil permaneceram livres do *Aedes aegypti* até 1976. Com o ressurgimento do mosquito, deu-se início a uma onda de epidemias começando em 1981, em Roraima, com isolamento dos sorotipos 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4). Em 1986, ocorreu uma epidemia de DENV-1 no Rio de Janeiro, seguida da introdução do DENV-2 (1990) e DENV-3 (2000), resultando na circulação endêmica e epidêmica do vírus por todo o país. Entre 1995 e 2010, o número de municípios infestados pelo mosquito mais que dobrou, passando de 1.753 para 4.007 (Figura 2) (MOURA, 2011).

**Figura 2** - Municípios infestados pelo *A. aegypti* em 1995 e 2010.



Fonte: Ministério da Saúde (BRASIL, 2010).

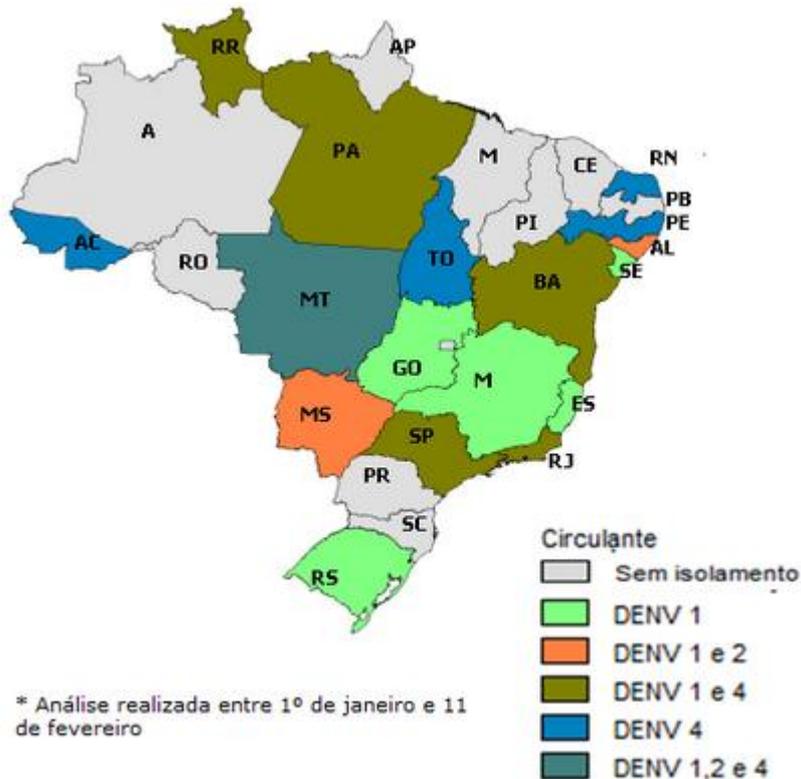
Nota: Em vermelho estão as áreas infestadas pelo mosquito *A. Aegypti*, mostrando que em cinco anos o número de municípios brasileiros com a presença do mosquito mais que dobrou.

O DENV-4 isolado no Brasil durante um surto ocorrido no estado de Roraima entre os anos de 1981 e 1982 (OSANAI *et al.*, 1983), desde então não tinham casos registrados no país, sendo reintroduzido no Brasil em 2010, quando surgiram os primeiros casos na região Norte do país, nos estados de Roraima, Pará e Amazonas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA, 2011).

O Brasil registrou 77% de redução nos casos graves de dengue no período comparativo entre janeiro a dezembro 2010 e janeiro a dezembro de 2012. Até 22 de dezembro de 2012 foram registrados 3.965 casos graves em todo o país, contra 17.475 no mesmo período de 2010. O número de mortes por dengue também apresentou queda de 57% em comparação com 2010. De janeiro até 22 de dezembro de 2012, foram confirmados 283 óbitos, sendo que no mesmo período de 2010 foram 656 (BRASIL, 2013).

Em relação à circulação viral no Brasil, até o momento, foi detectada a circulação dos quatro sorotipos do vírus dengue: DENV 1, 2, 3 e 4 (Figura 3).

**Figura 3** - Sorotipos circulantes, Brasil, 2012.



Fonte: Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).

Nota: O mapa mostra os sorotipos do DENV encontrados nos diferentes estados brasileiros em 2012. Análise realizada entre 1 de janeiro e 11 de fevereiro de 2012.

Em Pernambuco, o culicídeo *A. aegypti* encontra-se, atualmente, disseminado em 100% dos municípios. Em 1987 houve a primeira epidemia no Estado, causada pelo sorotipo 1 (CORDEIRO, 2008). Em 1995, depois de sete anos sem registros de casos autóctones, uma nova epidemia ocorreu com a introdução do sorotipo 2 (CORDEIRO *et al.*, 2007a). Em 2002 houve o registro de outra epidemia com a entrada do sorotipo 3, na qual a Região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência regional do Brasil, tendo o estado de Pernambuco o maior índice da região (SOUZA, 2007). No período entre 2010 e 2012, foi observada uma redução de 83% no número dos casos graves de dengue, passando de 1.129 casos em 2010 para 187 em 2012. Os casos graves confirmados de dengue em Pernambuco diminuíram de 597 para 186 entre os anos de 2011 e 2012, no entanto o número de óbitos, no mesmo período, se manteve estável (Tabela 1) (BRASIL, 2013).

**Tabela 1** - Casos graves e óbitos por dengue confirmados 2011 e 2012 por Região e Unidade Federada.

| País / Região / UF  | Semana epidemiológica 1 a 52 |              |             |             |
|---------------------|------------------------------|--------------|-------------|-------------|
|                     | Casos graves                 |              | Óbitos      |             |
|                     | 2011                         | 2012         | 2011        | 2012        |
|                     | Confirmados                  | Confirmados  | Confirmados | Confirmados |
| Rondônia            | 32                           | 14           | 3           | 1           |
| Acre                | 31                           | 5            | 2           | 0           |
| Amazonas            | 274                          | 18           | 16          | 4           |
| Roraima             | 20                           | 2            | 1           | 0           |
| Pará                | 195                          | 92           | 20          | 4           |
| Amapá               | 41                           | 17           | 0           | 0           |
| Tocantins           | 51                           | 37           | 4           | 5           |
| <b>Norte</b>        | <b>644</b>                   | <b>185</b>   | <b>46</b>   | <b>14</b>   |
| Maranhão            | 159                          | 44           | 19          | 11          |
| Piauí               | 65                           | 40           | 2           | 5           |
| Ceará               | 645                          | 215          | 62          | 34          |
| Rio Grande do Norte | 577                          | 291          | 17          | 8           |
| Paraíba             | 206                          | 141          | 8           | 12          |
| Pernambuco          | 597                          | 186          | 25          | 25          |
| Alagoas             | 71                           | 132          | 8           | 9           |
| Sergipe             | 81                           | 45           | 5           | 1           |
| Bahia               | 336                          | 239          | 16          | 29          |
| <b>Nordeste</b>     | <b>2.737</b>                 | <b>1.333</b> | <b>162</b>  | <b>134</b>  |
| Minas Gerais        | 207                          | 74           | 18          | 12          |
| Espírito Santo      | 1.834                        | 502          | 19          | 11          |
| Rio de Janeiro      | 3.790                        | 890          | 134         | 40          |
| São Paulo           | 507                          | 81           | 56          | 15          |
| <b>Sudeste</b>      | <b>6.338</b>                 | <b>1.547</b> | <b>227</b>  | <b>78</b>   |
| Paraná              | 229                          | 17           | 14          | 1           |
| Santa Catarina      | 1                            | 0            | 0           | 0           |
| Rio Grande do Sul   | 1                            | 0            | 0           | 0           |
| <b>Sul</b>          | <b>231</b>                   | <b>17</b>    | <b>14</b>   | <b>1</b>    |
| Mato Grosso do Sul  | 131                          | 104          | 2           | 6           |
| Mato Grosso         | 46                           | 195          | 5           | 20          |
| Goias               | 409                          | 671          | 27          | 31          |
| Distrito Federal    | 9                            | 3            | 1           | 0           |
| <b>Centro Oeste</b> | <b>595</b>                   | <b>973</b>   | <b>35</b>   | <b>57</b>   |
| <b>Brasil</b>       | <b>10.545</b>                | <b>4.055</b> | <b>484</b>  | <b>284</b>  |

Fonte: Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).

Nota: A tabela mostra que os casos graves confirmados de dengue em Pernambuco diminuíram de 597 para 186 entre os anos de 2011 e 2012, no entanto o número de óbitos, no mesmo período, se manteve.

## 1.2 Vírus dengue

O DENV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e é representado por quatro sorotipos antigênicos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (ROTHMAN, 2004). Essa classificação em sorotipos é tradicionalmente baseada em suas características antigênicas, analisadas por testes como neutralização viral, imunofluorescência em cultura de células, por fixação de complemento e estudos de painéis de anticorpos monoclonais (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

O vírus se liga às células hospedeiras permissivas através de receptores presentes na superfície celular. É consenso geral que células da linhagem fagocítica mononuclear (monócitos, macrófagos e células dendríticas) são alvos primários *in vivo*. A internalização e

acidificação no endossomo e fusão das membranas viral e vesicular permitem a entrada do nucleocapsídeo no citoplasma e desempacotamento do genoma. Em seguida, tem início a replicação do genoma e montagem de novas partículas virais (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

O DENV é esférico, coberto por um envelope lipídico, apresenta nucleocapsídeo icosaédrico (aproximadamente 30 nanômetros de diâmetro) e seu genoma tem 10,2 kb sendo de RNA fita simples (ssRNA) com polaridade positiva. O genoma dos flavivírus possui apenas uma fase aberta de leitura (*open reading frame – ORF*), codificando uma poliproteína (aproximadamente 3.400 aminoácidos), que origina três proteínas estruturais (envelope - E, capsídeo - C e membrana - M) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) sendo flanqueada por duas regiões não codificantes (5' e 3') (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). As proteínas estruturais formam a partícula viral icosaédrica, coberta por um envelope lipídico contendo proteínas do E e da prM/M. As proteínas não-estruturais participam da replicação do RNA genômico, da montagem do vírion e da evasão da resposta imune inata do hospedeiro (NOBLE *et al.*, 2010).

A proteína C tem um peso molecular em torno de 12 kDa e forma juntamente com o RNA viral o nucleocapsídeo (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Possui uma alta proporção de aminoácidos básicos que parece neutralizar a carga negativa da molécula de RNA viral com a qual está associada (CHANG, 1997).

Duas formas de proteínas M têm sido caracterizadas: prM contida em vírions intracelulares imaturos e a proteína M contida em vírions maduros extracelulares. A clivagem específica de prM (22 kDa) durante a maturação viral resulta na formação da proteína M (8 kDa). Esta clivagem parece preceder a liberação do vírus da célula e ser um evento terminal na morfogênese do vírion, resultando na reorganização da estrutura superficial do vírus para exposição do domínio de ligação do receptor E, e conseqüente aumento da infectividade viral (HENCHAL; PUTNAK, 1990; YU *et al.*, 2008).

A proteína estrutural E, uma glicoproteína de 55 a 60 kDa, é associada a muitas atividades biológicas dos vírions, tais como: ligação ao receptor, hemaglutinação de eritrócitos, estimulação do sistema imune através da indução de anticorpos neutralizantes e proliferação de monócitos / macrófagos, adesão e fusão específica de membrana, penetração e montagem viral (CHANG, 1997; HENCHAL; PUTNAK, 1990). Proteínas E do vírus dengue são glicosiladas diferentemente, de acordo com o sorotipo e as células em que o vírus é

propagado. A glicosilação de E tem sido relacionada com a ligação ao receptor e fusão endossomal (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Com relação às proteínas não estruturais, NS1, NS3 e NS5 são as mais conservadas e também de maior peso molecular entre os flavivírus (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A glicoproteína NS1 (46 kDa) atua na fase precoce da infecção viral (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008) e é expressa em três formas: uma forma residente no retículo endoplasmático (RE) que co-localiza com o complexo de replicação viral, uma forma ancorada na membrana e uma forma secretada (sNS1) (LINDENBACH; RICE, 2003). Essa forma secretada, assim como a glicoproteína E, é um alvo dominante da imunidade humoral e pode ter um papel significante na patogênese da doença (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A NS2a (18 a 22 kDa) é requerida para o apropriado processamento proteolítico de NS1 (CHANG, 1997). A maior parte das clivagens proteolíticas na poliproteína precursora, dentro da região das proteínas não estruturais dos flavivírus, são efetuadas por uma protease composta de duas proteínas virais, a NS2b e NS3 (FALGOUT; MILLER; LAI, 1993).

A NS3 (67 a 70 kDa) se apresenta em contato com a superfície celular ou é secretada. Possui atividades enzimáticas multifuncionais, tais como protease, NTPase e RNA helicase trifosfatase (TEO; WRIGHT, 1997; ROEHIG, 1997). O processamento da poliproteína precursora em proteínas maduras é realizado por uma peptidase sinal da célula hospedeira e pela NS3 serina protease, o que exige a NS2b como um co-fator (MURTHY *et al.*, 2000). A presença de NS3 estimula a destruição das células infectadas por linfócitos T - citóxicos. Linfócitos T - auxiliares e citotóxicos de pacientes com dengue apresentam capacidade de reconhecer epítomos das proteínas E, NS1 e NS3 (FIGUEIREDO, 1999a).

A proteína NS4 é clivada, gerando as proteínas NS4a (16 kDa) e NS4b (28 kDa), que estão implicadas na localização apropriada de proteínas virais e montagem do vírion (LINDENBACH; RICE, 2003), atuando juntamente com as proteínas NS2a e NS2b na associação à membrana da célula infectada durante o processo de maturação viral (MONATH; HEINZ, 1996). Tem sido citada a capacidade de NS4a, juntamente com NS2a, de bloquear a tradução de sinal mediada por IFN. NS4 é um potente inibidor de sinalização de interferon  $\beta$  (IFN-  $\beta$ ) e interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

As menores proteínas, NS2A, NS2B, NS4A e NS4B, são pouco conservadas entre os flavivírus e indicações sugerem que participam do complexo de replicação viral como componentes de membrana (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A proteína NS5 (105 kDa) é a maior e mais conservada proteína entre as proteínas dos flavivírus. Ela serve como RNA polimerase viral RNA-dependente. NS5 também pode induzir a transcrição e tradução de interleucina-8 (IL-8) (CHANG, 1997; LINDENBACH; RICE, 2003), que está correlacionada a trombocitopenia e ao aumento dos níveis séricos de alanina transaminase, um indicador de lesão hepática. Além disso, foi também demonstrado que a IL-8 é responsável por mediar a permeabilidade vascular durante a infecção pelo DENV (ESPADA-MURAO; LYRE; MORITA, 2011).

Algumas dessas proteínas do DENV servem como moléculas antagonistas que bloqueiam diretamente as vias intracelulares que conduzem à produção e sinalização de IFN-I, inibindo, dessa maneira, as diferentes etapas da resposta imune inata (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012). Detalhes de quais e como essas proteínas atuam para evadir a resposta imune do hospedeiro são descritos mais adiante no presente trabalho.

### ***1.3 Modo de Transmissão***

A dengue é uma doença causada por arbovírus, transmitido ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* (Figura 4) considerado seu principal vetor (LIGON, 2004). O *A. aegypti* é um inseto cosmopolita encontrado principalmente em locais de grande concentração humana (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008). Fatores como a urbanização acelerada, facilidades de transporte entre regiões e falência dos programas de controle do *A. aegypti* favorecem o aumento da transmissão da dengue. O *A. albopictus* é o vetor de manutenção da dengue na Ásia, mas, até o momento não foi associado à transmissão da dengue nas Américas (SCHATZMAYR, 2000; TAUILL, 2001, 2002).

**Figura 4** - Vetor do DENV, o culicídeo *A. aegypti*.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2007).

Nota: *Aedes aegypti*, inseto cosmopolita encontrado principalmente em locais de grande concentração humana, considerado o principal transmissor da dengue.

Na natureza, os machos culicídeos nutrem-se de néctar de flores e suco de frutos que são essenciais para a sobrevivência de muitas espécies. Contudo, o repasto sangüíneo é feito pelas fêmeas dos mosquitos anautógenos, sendo imprescindível para a maturação dos ovos (BARATA *et al.*, 2001).

As fêmeas do mosquito *A. aegypti*, responsáveis pela transmissão da doença, são mais ativas durante o dia, com picos de atividade entre 2 e 3 horas após o nascer do dia e algumas horas antes do anoitecer (GUBLER, 1998) e se infectam ao ingerir sangue de um indivíduo durante o período de viremia (cerca de 5 dias), tornando-se competente para transmitir a doença a um indivíduo susceptível depois de um período de incubação extrínseca que dura de 8 a 12 dias (RIGAU-PÉREZ *et al.*, 1998).

Os mosquitos *A. aegypti* podem transmitir o DENV para sua prole através da transmissão transovariana. Neste tipo de transmissão é observada uma proporção de um ovo infectado para cada quinhentos ovos da prole. Essa estratégia de transmissão vertical é indispensável nos períodos de condições limitantes, tais como secas e grandes estiagens (MONATH, 1994). A transmissão mecânica também é possível, quando o repasto é interrompido e o mosquito, imediatamente, se alimenta num hospedeiro susceptível próximo. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções com uma pessoa sadia, nem de fontes de água ou alimento (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). No entanto, assim como outros vírus transmissíveis por transfusão, o DENV pode ser transmitido através do contato sangue-sangue, picada de agulha, exposição muco cutânea e intraparto. Casos de transmissão transfusional vêm sendo reportados e segundo Mohammed H. e colaboradores (MOHAMMED *et al.*, 2008) mais casos de dengue por transfusão vem

acontecendo, enfatizando que "a transmissão de dengue por esta via é mais comum do que documentada" (RAMOS, 2008).

#### **1.4 Formas Clínicas**

A dengue é uma doença febril aguda, com duração de cinco a sete dias (GUZMÁN, 2002; HARRIS *et al.*, 2000). Um amplo espectro de quadros clínicos pode ser causado pelo DENV. A doença pode se manifestar assintomaticamente ou apresentar sintomas brandos como uma febre indiferenciada, caracterizando a FD, ou ainda, causar quadros mais graves como a FHD e a Síndrome do choque da dengue (SCD) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000).

Existem quatro sorotipos do DENV e todos eles podem causar desde formas assintomáticas até as formas mais graves da doença. A infecção com um sorotipo induz imunidade permanente específica ao sorotipo infectante, conferindo apenas uma curta imunidade cruzada (heterotípica) não protetiva para os outros sorotipos. Desta forma, pessoas que vivem em áreas hiperendêmicas, onde circulam múltiplos sorotipos do DENV, podem ser infectadas pelos quatro diferentes sorotipos do vírus da dengue durante sua vida (GUBLER, 1998; SABIN, 1952).

A FD apresenta-se em geral de forma benigna e autolimitada (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). Esta forma é caracterizada por febre alta (39°C a 40°C), associada à cefaléia, prostração, mialgia, artralgia, dor retroorbitária, exantema maculopapular acompanhado ou não de prurido (BRASIL, 2005). Anorexia, náuseas, vômitos e diarreia também podem ser observados (RIGAU-PÉREZ, 2002).

Por outro lado, os sintomas da FHD, apesar de semelhantes aos da febre da dengue ainda apresenta plaquetopenia (plaquetas < 100.000/mm<sup>3</sup>), aumento da permeabilidade capilar, extravasamento de plasma e anormalidades homeostáticas, sobretudo hemoconcentração. Este quadro pode ainda evoluir rapidamente para insuficiência circulatória e SCD podendo levar a óbito em 12 a 24 horas ou à recuperação rápida após terapia antichoque apropriada. A SCD é a forma mais comum de morte causada por essa patologia (GUBLER, 1998; BRASIL, 2009).

Casos complicados cujos critérios não completam suficientemente as exigências da OMS para a classificação da FHD, especialmente a hemoconcentração, são classificados como dengue clássica complicada (DCC) (CORDEIRO *et al.*, 2007b). Nessa situação, a

presença de um dos itens a seguir caracteriza o quadro: alterações neurológicas; disfunção cardiorrespiratória; insuficiência hepática; plaquetopenia igual ou inferior a  $50.000/\text{mm}^3$ ; hemorragia digestiva; derrames cavitários ou leucometria global igual ou inferior a  $1.000/\text{mm}^3$  (BRASIL, 2007).

De acordo com o guia para dengue da Organização Mundial de Saúde (2009), entretanto, os casos graves de dengue (DCC, FHD e SCD) devem ser denominados de dengue grave. Para isso, é necessária a presença de um dos seguintes sinais de alerta: extravasamento de plasma com consequente choque e/ou acumulação de fluido, com ou sem complicações respiratórias; e/ou sangramento grave; e/ou órgão prejudicado gravemente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009).

É importante distinguir as formas benignas da dengue daquelas de maior gravidade, que requerem tratamento diferenciado. O diagnóstico precoce e o pronto atendimento são essenciais para a redução do índice de mortalidade causado por FHD/SCD (LIGON, 2004; ROTHMAN, 2004).

#### 1.4.1 Imunopatologia da FHD

A resposta imunológica à infecção aguda por dengue pode ser primária ou secundária. A resposta primária ocorre em pessoas não expostas anteriormente ao flavivírus, no qual o título dos anticorpos se eleva lentamente. Já a resposta secundária ocorre em indivíduos com infecção aguda por dengue, mas que tiveram infecção prévia pelo vírus, no qual o título de anticorpos IgG se eleva rapidamente, atingindo níveis altos (BRASIL, 2009).

Não se conhece bem a patogênese da FHD/SCD nem que condições do hospedeiro favorecem a gravidade da doença. Fatores epidemiológicos e virológicos, fatores de risco do hospedeiro, como idade, estado nutricional, sexo, doenças crônicas e raça, são fatores de risco que fazem a doença mais freqüente em um determinado grupo (LEI, 2001; SIERRA, KOURI; GUZMÁN, 2007). O risco de FHD é mais alto quando dois ou mais sorotipos do vírus estão circulando simultaneamente (RIGAU-PÉREZ *et al.*, 1998).

Algumas teorias tentam explicar as alterações que desencadeiam o fenômeno da FHD (GUIMARÃES, 1999).

Halstead e colaboradores sugeriram um papel na patogênese para os anticorpos não-neutralizantes produzidos na infecção pelo DENV, baseado em dados epidemiológicos

(HALSTEAD, 1988). A teoria da amplificação dependente de anticorpos (*antibody-dependent enhancement* - ADE) explica porque indivíduos que tiveram infecção prévia com um sorotipo do DENV, se infectados por um sorotipo diferente, teriam maior predisposição em desenvolver a FHD em relação aos de infecção primária. Os anticorpos heterólogos produzidos na infecção do primeiro sorotipo estariam em níveis sub-neutralizantes durante a infecção pelo segundo sorotipo. A linhagem monocítica foi descrita como principal alvo de infecção dos DENV e dispõe de alta expressão de receptores FcR $\gamma$ . Sendo assim, os anticorpos heterólogos não neutralizantes ligados aos vírus, seriam atraídos para a superfície celular através da ligação da porção Fc da imunoglobulina ao FcR $\gamma$ , aproximando o vírus do seu receptor e resultando no aumento de infecção das células (HALSTEAD, 2003). Atualmente, porém, essa teoria foi contestada por alguns trabalhos, que através de ensaios *in vitro*, relatam a ausência de correlações entre a gravidade da infecção secundária e a presença de anticorpos circulantes no plasma de pacientes com infecção primária (LAOPRASOPWATTANA *et al.*, 2005).

Outra teoria sugerida para explicar a patogênese da FD/FHD é a da virulência viral (RICO-HESSE, 1990). A teoria da virulência viral associa a gravidade da doença a uma maior virulência de determinadas cepas, ocorrendo através de passagens sucessivas tanto no hospedeiro humano quanto no vetor, gerando mutações no código genético do DENV (ROSEN, 1977). Há relatos que sugerem que o aumento da virulência seja um fator de risco independente da pré-infecção por dengue (AGARWAL, 1998).

Alguns autores acreditam também que os riscos do desenvolvimento da FHD são resultantes multifatoriais (teoria integral de multicausalidade), ou seja, fatores como sorotipo e virulência viral, idade, sexo, status do sistema imunológico, fatores nutricionais e genéticos do hospedeiro estariam interagindo para dar origem à resposta contra a infecção, sendo ela benéfica ou prejudicial para o hospedeiro (GUZMAN; KOURI, 2002; MALAVIGE *et al.*, 2004).

Uma hipótese alternativa, às citadas anteriormente, propõe que a resposta imune inata inicial e, em particular a resposta do IFN-I, possa determinar a resposta subsequente e o desfecho clínico da doença. A resposta do IFN-I contra o DENV ainda não é bem compreendida (UMAREDDY *et al.*, 2008), mas supõe-se que a intensidade de replicação do DENV no início da infecção esteja associada com a severidade da doença. Durante esta crítica

fase, os mecanismos inatos antivirais mediados por IFN  $\alpha/\beta$  são potencialmente as mais importantes vias de defesa do hospedeiro (MAZZON *et al.*, 2009).

O IFN-I e outros genes estimulados por IFN foram associados com a gravidade da doença em vários estudos clínicos. Estes estudos são caracterizados pelo constante encontro de resposta altamente ativada do IFN-I em casos não complicados de dengue, em contraste com um perfil de resposta IFN-I menos ativa em casos graves. A resposta menos ativa propiciaria uma maior viremia associada com a dengue grave. Esta resposta imune diferencial pode ser explicada por um perfil alterado de células produtoras de IFN-I durante a progressão da doença (ESPADA-MURAO; LYRE; MORITA, 2011).

Há cada vez mais evidências da importância do sistema imune inato na regulação e, eventualmente, na influência da patogênese da infecção por dengue. Enquanto que algumas respostas do IFN à dengue são protetoras, outras podem exercer efeitos relacionados com a doença no hospedeiro. Mas, além dos IFNs, outras citocinas também têm sido relacionadas na patogênese dessa doença, tais como IL-4, TNF- $\alpha$  e outras. Por exemplo, a IL-4 tem um efeito sinérgico na permeabilidade da célula endotelial quando combinada com a expressão de TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ , e o aumento de todas as três citocinas foram relatadas em dengue grave. (ESPADA-MURAO; LYRE; MORITA, 2011).

### ***1.5 Controle e Tratamento***

O controle e a erradicação da dengue através do combate ao vetor tem se tornado cada vez mais difícil devido à superpopulação, ao crescimento urbano e ao grande aumento das viagens domésticas e internacionais, o que tem contribuído para a disseminação da doença (DENGUE..., 2008).

Até o momento não existe tratamento específico para a dengue. Por isso, o tratamento recebido pelos pacientes, resume-se a uma terapia de suporte, onde estes devem manter-se em repouso, recebendo analgésicos e antipiréticos, em caso de dores e febre, respectivamente. Casos de FHD e SCD necessitam de reposição de fluidos com soluções eletrolíticas, podendo evitar coagulação intravascular disseminada (HENCHAL; PUTNAK, 1990). A implementação de sistemas eficazes de vigilância e o desenvolvimento de uma vacina efetiva são consideradas ações prioritárias pela OMS (LIGON, 2004).

Enquanto não houver uma vacina eficaz e segura disponível para a população, o controle efetivo do mosquito, envolvendo a comunidade e a vigilância epidemiológica laboratorial são as melhores estratégias para prevenir epidemias de dengue e reduzir o impacto social de FHD/SCD (DE SIMONE *et al.*, 2004).

Uma vacina ideal para dengue deve promover imunização prolongada contra os quatro sorotipos do DENV, não causando o fenômeno ADE, que inicia o mecanismo fisiopatológico responsável pela FHD; ter baixo custo; ter baixa toxicidade (principalmente neuro e hepatotoxicidade); e manter títulos virais no armazenamento prolongado (BHAMARAPRAVATI; YOKSAN, 1997; DEEN *et al.*, 2004; DEROECK; DEEN; CLEMENS, 2003; GUZMÁN, 1998; KHIN *et al.*, 1994; SWAMINATHANAND; KHANNA, 2003).

Os laboratórios acadêmicos e as empresas farmacêuticas têm desenvolvido diversas vacinas candidatas contra a dengue, utilizando diferentes tecnologias, como, por exemplo, vacinas contendo vírus vivos atenuados; vetores virais recombinantes que expressam os antígenos do envelope do DENV; proteínas recombinantes; e vacinas de DNA. Até o presente, nenhuma vacina contra a dengue foi registrada, no entanto, dentre as várias candidatas, a vacina desenvolvida pela Sanofi Pasteur, uma vacina tetravalente que contém vírus recombinantes atenuados e que tem como base a cepa da vacina 17D contra a febre amarela (YF17D) (GUY *et al.*, 2011), está a frente nas pesquisas, mostrando eficácia de 61,2% contra o tipo 1 do DENV, 81,9% contra o tipo 3 e 90% contra o tipo 4. Não sendo confirmada proteção contra o vírus tipo 2 no contexto epidemiológico específico da Tailândia, mas os estudos continuam em andamento (SANOFI PASTEUR, 2010).

### ***1.6 Resposta imune à infecção viral***

A imunidade ou resistência do hospedeiro contra as infecções virais depende da atuação integrada da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa. Os mecanismos envolvidos na resposta imune inata atuam imediatamente após o contato do hospedeiro com os antígenos virais, não possuem capacidade de discriminação entre os vírus e não necessitam de exposição prévia para serem desencadeados (KREUTZ, 2007). Os principais componentes do sistema imune inato são: (1) barreiras físicas e químicas, tais como epitélio e as substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais; (2) células fagocitárias (neutrófilos e

macrófagos) e células NK (*natural killers*); (3) proteínas do sangue, incluindo frações do sistema complemento e outros mediadores da inflamação e (4) proteínas denominadas citocinas, que regulam e coordenam várias atividades das células da imunidade natural (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Contudo, nem sempre os componentes da imunidade inata conseguem eliminar o patógeno, entrando em ação a imunidade adquirida (JANEWAY *et al.*, 2006). Os mecanismos envolvidos na resposta imune adquirida, por sua vez, desenvolvem-se sequencialmente e de forma mais lenta e sincronizada, resultando na indução de células efetoras, que irão combater o agente, e de células de memória, que possuem vida longa e que serão efetivamente reestimuladas em exposições posteriores ao mesmo agente (KREUTZ, 2007). Esta é induzida pela ativação de células apresentadoras de antígenos, que ativarão linfócitos patogéno-específicos. Os linfócitos são responsáveis pela eliminação direta do patógeno, ativação de células fagocitárias para o local da infecção e pela produção de anticorpos específicos. A ativação da resposta adquirida demora cerca de 4 a 7 dias, daí a importância do primeiro combate através da resposta inata que, além disso, é responsável por desencadear os processos que acarretam na ativação da imunidade adquirida (JANEWAY *et al.*, 2006).

#### 1.6.1 Sistema imune inato – resposta via interferon

Os IFNs são citocinas que desempenham um papel importante na resposta imune e na defesa contra os vírus. Historicamente, os IFNs foram divididos em duas classes principais: tipo I (estável em ácido) e tipo II (instável em ácido), com base na sua capacidade de manter a atividade biológica em condições ácidas. A sinalização do IFN-I (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ ,  $\tau$ ,  $\omega$ ) ocorre através do complexo heterodimérico IFNAR1-IFNAR2, que ativa quinases JAK1 e TYK2 e causam dimerização dos fatores STAT1 e STAT2, os quais se ligam ao elemento de resposta estimulado por IFN (*IFN-stimulated response element - ISRE*). Já o IFN do tipo II (IFN- $\gamma$ ) através de sinais do complexo heterodimérico IFNGR1-IFNGR2, ativa as quinases JAK1 e JAK2 e provoca dimerização do fator STAT1, que se liga ao promotor GAS (SMILOVIĆ *et al.*, 2008).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores sendo o IFN-I ( $\alpha/\beta$ ) a maior arma na defesa antiviral contra todos os tipos de vírus (HALLER; KOCHS; WEBER, 2005).

O IFN  $\alpha$  é uma família de 20 polipeptídios estruturalmente relacionados, codificados cada um por um gene distinto. Os fagócitos mononucleares são a principal fonte de IFN  $\alpha$ . O IFN  $\beta$  é uma única proteína produzida por muitas células, tais como os fibroblastos. O estímulo mais potente para a produção do IFN-I é a infecção viral, especialmente de dsRNA. Embora os IFN  $\alpha$  e  $\beta$  sejam estruturalmente diferentes, eles se ligam ao mesmo receptor na superfície celular (*Type I IFN receptor* - IFNAR) e induzem respostas biológicas semelhantes. O receptor de IFN-I é um heterodímero de dois polipeptídios estruturalmente relacionados (IFNAR1-IFNAR2), um se liga à citocina e o outro transduz sinais pela via JAK/STAT (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

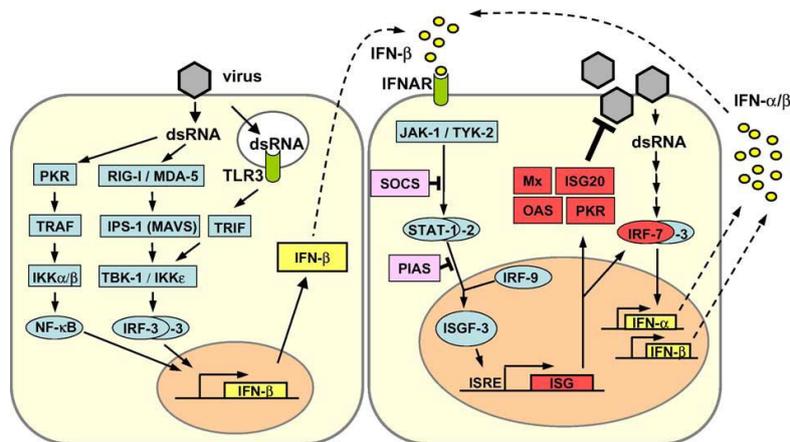
A produção de IFN-I após infecção viral é provocada pelo reconhecimento de estruturas conservadas dos patógenos ou produtos conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) por sensores específicos do hospedeiro conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs) (DAFFIS *et al.*, 2008). Após a detecção do patógeno viral, a célula ativa múltiplas vias distintas de sinalização para induzir uma série de fatores de transcrição, que por sua vez levam a uma reprogramação do perfil de expressão gênica e a indução de uma grande variedade de genes que estabelecem um estado antiviral (FREDERICKSEN *et al.*, 2008).

De forma resumida, os PRRs reconhecem RNA de fita dupla ou fita simples de vírus e DNA com motivos CpG na superfície de células (*toll like receptor 9* - TLR9), em endossomos (TLR3, TLR7 e TLR8), ou no citoplasma (MDA5 e RIG-I) e ativam os fatores de transcrição, tal como, NF $\kappa$ -B, IRF (*Interferon regulatory factor*) 3 e 7 a coordenar programas anti-virais via indução do IFN-I e outras citocinas inflamatórias (KAWAI; AKIRA, 2007; DAFFIS *et al.*, 2008). Os principais PRRs que reconhecem vírus de RNA são os TLR 3, 7 e 8, os receptores semelhantes ao gene induzível pelo ácido retinóico I (RIG-I e MDA5), além da proteína quinase R (PKR - *Protein Kinase R*) (BIRON; SEM, 2007; KOYAMA *et al.*, 2008).

Uma vez sintetizado, o IFN-I provoca seus efeitos antivirais ligando-se de forma autócrina e parácrina ao seu receptor (LÓPEZ *et al.*, 2003), levando à ativação de quinases Jak1 e TYK2 e, conseqüentemente de proteínas STAT (STAT1 e STAT2) (JONES *et al.*, 2005; HALLER; KOCHS; WEBER, 2005). Este evento leva à ativação da via de sinalização JAK-STAT (LÓPEZ *et al.*, 2003), que termina na associação das proteínas STAT ao IRF9

para formar o complexo do gene do fator 3 estimulado por IFN (*IFN-stimulated gene factor 3- ISGF3*) (SETH; SUN; CHEN, 2006). O complexo ISGF3 transloca-se para o núcleo e inicia a transcrição dos genes estimulados por interferon (ISGs), levando ao aumento da regulação da transcrição de centenas de genes celulares e a indução de um estado antiviral (JONES *et al.*, 2005). Na Figura 5 estão ilustradas as duas vias de atuação do IFN-I, a via de indução e a via de sinalização como foi descrito acima.

**Figura 5** - Indução, sinalização e ação do IFN tipo I.



Fonte: Jones *et al.* (2005).

Nota: Esquema mostrando os fatores envolvidos na indução, sinalização e ação do IFN-I após uma infecção viral.

A ação antiviral do IFN-I é primariamente uma ação parácrina, na qual uma célula infectada por vírus secreta IFN para proteger as células vizinhas que ainda não estão infectadas. Uma célula que respondeu ao IFN e está resistente a infecção viral está num “estado antiviral”. O IFN-I secretado por uma célula infectada pode agir também de modo autócrino para inibir a replicação viral naquela célula (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

O IFN  $\gamma$ , também chamado IFN imune ou do tipo II, possui alguma atividade antiviral, mas não é um IFN antiviral potente e age principalmente como uma citocina efetora das respostas imunes. O IFN do tipo II aumenta a defesa antimicrobiana pela ativação de diversas células monocíticas, sua ativação leva a síntese de enzimas necessárias para a geração dos intermediários do oxigênio reativo contribuindo para a morte de organismos fagocitados, particularmente bactérias. O receptor para IFN  $\gamma$  é composto de dois polipeptídeos estruturalmente homólogos (IFNGR1-IFNGR2), um se liga à citocina e o outro participa fazendo a sinalização (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

### 1.6.2 Resposta da via IFN-I na infecção pelo DENV

O DENV é um patógeno humano, que infecta produtivamente uma grande variedade de células envolvidas na resposta imune, como monócitos, macrófagos, células B, células dendríticas (DCs), entre outros (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012).

A cinética de infecção das diferentes células do sistema imunológico não está bem descrita, devido à falta de modelos de camundongos imuno-competentes para a dengue. No entanto, nos camundongos defeituosos de sinalização de IFN-I, um dos modelos atuais mais aceitos para a dengue, foi demonstrado que DCs e macrófagos são produtivamente infectados pelo DENV (AGUIRRE *et al.*, 2012).

As DCs apresentam papel importante nas respostas imune inata e adaptativa a organismos infecciosos devido a capacidade de produzir IFN-I (DEAUVIEAU, 2007; WANG *et al.*, 2006). Em particular, as DCs plasmocíticas (pDCs) representam a principal fonte na produção de IFN  $\alpha$  (HALLER; KOCKS; WEBER, 2006; PALUCKA, 2000; WANG *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2000). Além disso, as pDCs interagem com as DCs mielóides (mDCs) na indução da resposta imune inata antiviral e modela os efeitos da resposta imune adaptativa (WANG *et al.*, 2006).

Após a picada do *Aedes aegypti* o DENV penetra na corrente sanguínea do hospedeiro, sendo primeiramente reconhecido pelas células dendríticas (DCs) intersticiais através da ligação da proteína do envelope viral (E) ao receptor DC-SIGN dessas células (NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÉS; CEDILLO-BARRÓN, 2005). Essa ligação leva à entrada do vírus, que se replica no citoplasma da célula hospedeira, sendo reconhecido pelos PRRs, sobretudo os TLR3 e TLR7 (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; WANG *et al.*, 2006; TSAI *et al.*, 2009). O reconhecimento pelos PRRs leva a ativação da cascata de fosforilação de proteínas, culminando no acionamento do fator de transcrição nuclear NF $\kappa$ -B, que será então levado ao núcleo onde promove a expressão de citocinas inflamatórias estimuladoras de outras células do sistema inato (NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÉS; CEDILLOBARRÓN, 2005).

Para muitos vírus, um passo inicial no estabelecimento de infecção é a evasão da resposta inata antiviral fornecida pelo sistema celular do IFN. Os IFN  $\alpha$  e  $\beta$  são secretados pelas células infectadas e exibem múltiplas propriedades biológicas antiproliferativas, incluindo efeitos antivirais e imunomoduladores. A indução e ativação de moléculas hospedeiras específicas pelo IFN bloqueiam a infecção viral em vários níveis, incluindo a

transcrição, tradução, e degradação do RNA (DIAMOND; ROBERTS *et al.*, 2000). Alguns dos exemplos mais notórios são: a proteína NS1 do vírus da influenza, que degrada o RIG-I, minimizando a detecção dos PAMPs virais pelos PRR ou o complexo protease NS34A do vírus da Hepatite C que cliva o adaptador IPS-1 para interromper a sinalização que tem fim com a ativação de IFR3, NFk-B e a subsequente produção de IFN-I humano em hepatócitos (AGUIRRE *et al.*, 2012).

Para infectar os seres humanos de forma eficiente, o DENV deve evitar ou inibir elementos fundamentais do sistema imunológico inato do hospedeiro, ou seja, a resposta do IFN-I (AGUIRRE *et al.*, 2012). O DENV tem evoluído com sucesso para superar a imunidade do hospedeiro natural e infectar seu hospedeiro usando uma combinação equilibrada de duas estratégias fundamentais, uma é a evasão da interação dos PAMPs com os PRRs celulares e a outra é através da inibição das diferentes etapas da resposta imune inata por meio da expressão de moléculas antagonistas que bloqueiam diretamente as vias intracelulares que conduzem à produção e sinalização de IFN-I (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012).

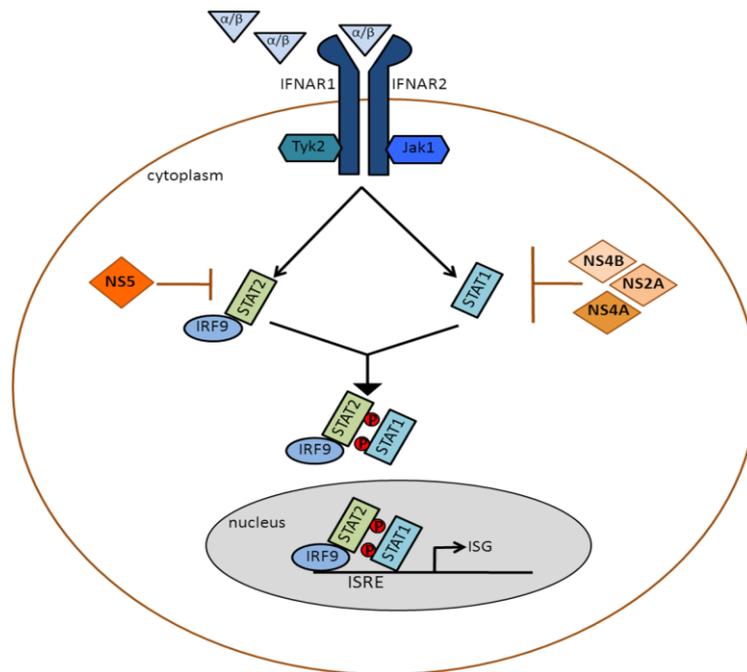
O DENV pode inibir a indução do IFN-I utilizando estratégias diferentes. Morrison e colaboradores usando um sistema de células primárias humanas mostraram que a infecção de DCs humanas com DENV não induziu a fosforilação de IRF-3, devido a ações resultantes da interação do complexo protease NS2B3 viral com componentes envolvidos, e ainda não identificados, na via de indução do IFN-I, resultando numa inibição da produção de IFN tipo I após a infecção pelo DENV. Além disso, o DENV pode escapar do encontro com sensores celulares por esconder os seus produtos de replicação em membranas derivadas do retículo endoplasmático (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012).

Ao contrário da lacuna existente no conhecimento sobre a inibição da via de indução do IFN-I pelo DENV, várias proteínas do DENV que inibem a sinalização do IFN-I já foram identificadas (RODRIGUEZ-MADOZ *et al.*, 2010).

O DENV codifica pelo menos quatro proteínas (NS2A, NS4A, NS4B e NS5) que inibem a sinalização do IFN-I humanos (Figura 6) (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012). A expressão de NS4B e, em menor grau, de NS2A e NS4A resultam na menor regulação de genes estimulados pelo IFN  $\beta$ . As células que expressam NS4B ou as células infectadas com o DENV não exibem STAT-1, após tratamento com IFN  $\alpha$  ou IFN  $\beta$ , indicando que o NS4B pode estar envolvido no bloqueio da sinalização do IFN-I durante as

infecções pelo DENV. Esta proteína, codificada por um vírus RNA de cadeia positiva, está implicada como um inibidor da sinalização do IFN-I (MUÑOZ-JORDÁN *et al.*, 2003). Enquanto a NS4B inibe a fosforilação da STAT-1 *in vitro*, a NS5 induz a degradação da STAT-2 em células infectadas pelo DENV (RODRIGUEZ-MADOZ *et al.*, 2010).

**Figura 6** - Inibição da via de sinalização do IFN-I pelo DENV.



Fonte: Morrison *et al.* (2012)

Nota: O esquema representa a via de sinalização do IFN-I na infecção de células pelo DENV, destacando onde as proteínas do vírus atuam para inibir essa via. O DENV antagoniza esta via de sinalização utilizando a proteína NS5 para degradar STAT2, e as proteínas NS2A, NS4A e NS4B para inibir as etapas *upstream* da ativação da proteína STAT1.

Em resumo, DENV pode conseguir inibir duas etapas fundamentais da resposta imune inata, tanto a indução/produção como a sinalização do IFN-I. Desta forma, o DENV reduz a expressão de centenas de genes induzíveis por IFN que iriam estabelecer o estado antiviral e controlar a propagação da infecção no hospedeiro (AGUIRRE *et al.*, 2012).

A base molecular da patogénia do DENV ainda não está totalmente esclarecida, devido, em parte, a falta de um modelo celular e animal onde as hipóteses de patogénia (tropismo células, ativação de resposta imunológica e outras), evolução clínica e epidemiológica possam ser testadas (FINK *et al.*, 2007; KYLE; BEATY; HARRIS, 2007; MONATH *et al.*, 2007).

### 1.7 PCR Quantitativa em Tempo Real

A PCR em tempo real é uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR. Durante a qPCR, o acúmulo de *amplicons* é detectado em "tempo real", a cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas sequência-específicas ou *primers* usados na reação (ALMEIDA; SADDI, 2007).

Utilizando a reação de qPCR podem ser realizados diferentes tipos de estudos, dentre eles: de quantificação absoluta, quantificação relativa e análise de *Single-nucleotide polymorphism* (SNP).

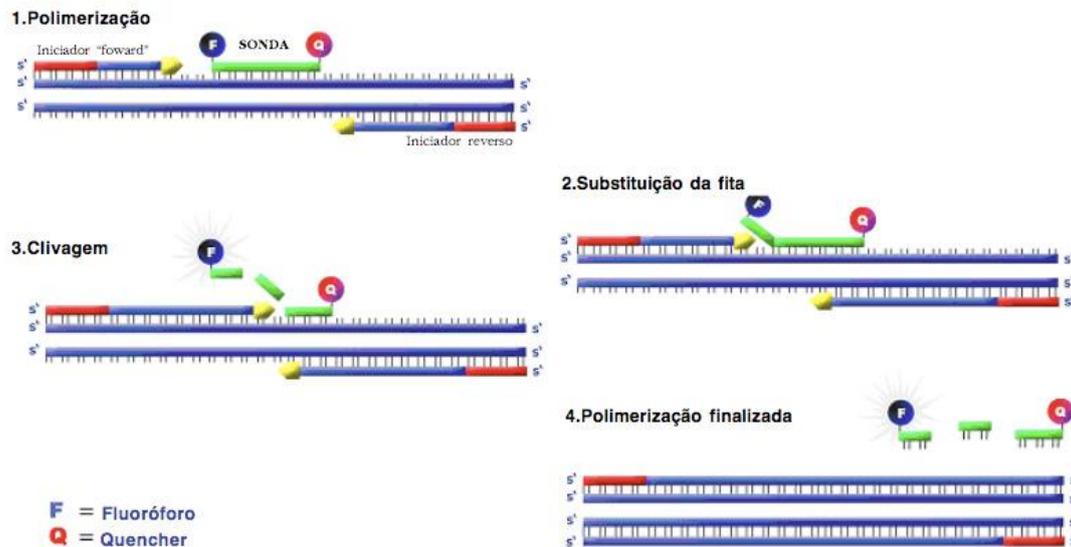
Nos estudos que envolvem quantificação relativa são feitas quantificações sempre em comparação com uma amostra de referência, ou seja, as quantificações são relativizadas (FRAGA; MEULIA; FENSTER, 2008). Esse tipo de estudo é muito utilizado nas análises de expressão gênica, fato que ocorre no presente estudo.

Existem quatro técnicas utilizadas na qPCR para detectar o produto amplificado: *molecular beacons*, sondas de hidrólise, sondas de hibridização e corantes intercalantes (BUSTIN, 2000; WATZINGER; EBNER; LION, 2006).

As sondas de hidrólise também denominadas de TaqMan® (Applied Biosystems) ou sondas 5' nuclease, são os ensaios mais descritos para detecção de DNA ou RNA viral (WATZINGER; EBNER; LION, 2006) e foram utilizadas no presente trabalho com o intuito de estudar os níveis de expressão dos genes que codificam os IFN  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  em PBMC de pacientes com diferentes formas clínicas da dengue. TaqMan® é uma sonda utilizada para detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade (5') um fluoróforo (molécula repórter), e na outra extremidade (3') um *quencher*, covalentemente ligados. Quando a molécula repórter na sonda TaqMan® é estimulada por uma fonte de luz apropriada para emitir fluorescência, a energia é transferida para o *quencher*, suprimindo a fluorescência do repórter. Durante a PCR em tempo real a sonda TaqMan® é degradada devido à atividade exonuclease 5'  $\rightarrow$  3' da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; WATZINGER; EBNER; LION, 2006), como pode ser observado na Figura 7 abaixo. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento de intensidade da fluorescência, ocorrendo a emissão de luz aumentada exponencialmente e que

ocorre somente quando a sonda hibridiza e a amplificação da sequência alvo é estabelecida (BUSTIN, 2000; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

**Figura 7 - PCR em tempo real baseada no sistema TaqMan®.**



Fonte: Novais e Pires-Alves (2004).

Nota: Esquema mostrando as etapas da PCR em tempo real baseada no sistema TaqMan. 1. Polimerização; 2. Substituição da fita; 3. Clivagem; 4. Polimerização finalizada. F = fluoróforo; Q = quencher.

### 1.7.1 Controles da reação

Em cada reação de qPCR é feito o controle da fluorescência basal através da utilização de um fluoróforo como referência passiva da reação. A maioria dos sistemas de qPCR utiliza o fluoróforo ROX (6-carboxi-X-rodamina) como referência passiva (SILVA, 2008). É através da leitura do ROX que é possível observar e normalizar a quantidade de fluorescência em cada amostra, isso porque o ROX está presente em todas as amostras (positivas e negativas).

Devem ser utilizados controles positivos e negativos em cada reação. Os controles negativos são de dois tipos: os que são comumente chamados de controle sem alvo (*non template control* – NTC) com todos os reagentes, no entanto sem alvo (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004) e os controles negativos com sequências que não devem ser amplificadas, uma vez que não são específicas para os iniciadores. Os controles positivos são aqueles que apresentam alvo em condições de amplificação e quantidade já conhecida.

Para o controle endógeno normalmente são escolhidos genes chamados de *housekeeping genes* ou genes constitutivos (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010). Esses genes são aqueles que apresentam expressão constitutiva em todos os tecidos de um organismo, por exemplo, genes da beta actina e do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) para amostras de humanos (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004). Nesse controle o que se pretende é ter a quantificação de um alvo presente em todas as amostras, normalizar e evitar resultados falsos negativos (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

### 1.7.2 Quantificação relativa

O método mais utilizado de quantificação relativa é o publicado por Livak e Schmittgen em 2001 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) que é o método cujo valor de quantificação relativa (*relative quantification* – RQ) é gerado a partir da fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

O valor de Ct (*cycle threshold*, representando o ciclo em que a amostra atinge o limite de positividade) é um valor logaritmo gerado no gráfico da curva de amplificação da reação de qPCR e os valores de  $\Delta Ct$  são gerados a partir da normalização dos valores de quantificação da amostra alvo em relação à amostra constitutiva, ou seja,  $\Delta Ct = (Ct \text{ alvo} - Ct \text{ controle endógeno})$ . O segundo valor de  $\Delta Ct$  é representado pelo valor de Ct da amostra com a qual se deseja comparar também normalizada ( $Ct \text{ referência} - Ct \text{ controle endógeno}$ ) (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

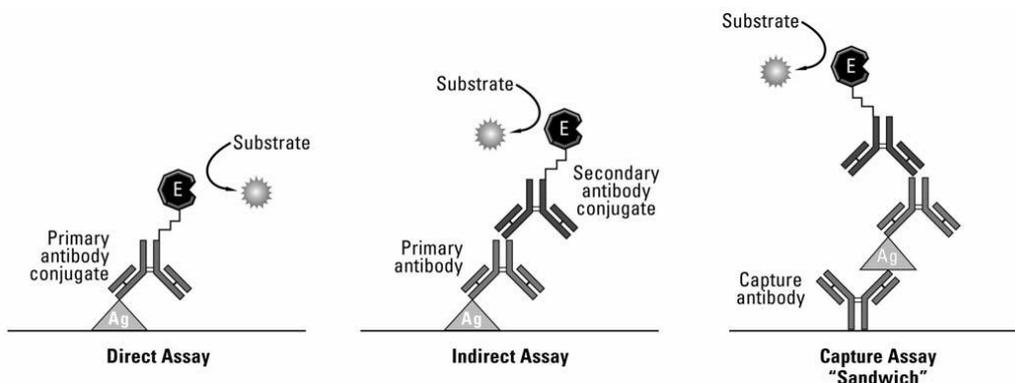
O número 2 que compõe a base da função exponencial denota que a amplificação dobra a quantidade de alvos a cada ciclo, isso em condições de reação onde a eficiência é de 100%. Para a utilização dessa fórmula é necessário levar em consideração dois aspectos: a reação ter 100% de eficiência e a utilização de uma amostra com expressão constante para normalização dos valores de expressão dos alvos – controle endógeno. Outra observação que deve ser considerada quando feita a escolha do método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  é que a reação não tenha muitos ciclos, em média 40, isso evitará que sejam utilizados valores de Ct que não estão na fase exponencial (DERVEAUX; VANDERSOMPELE; HELLEMANS, 2010).

### 1.8 Ensaio Imunoenzimático

O ELISA é um poderoso método para detecção e quantificação de uma proteína específica em uma mistura complexa. Originalmente descrito por Engvall e Perlmann (1971), o método permite a análise de amostras de proteínas imobilizadas em poços de microplacas de poliestireno de 96 cavidades e utilizam anticorpos marcados com enzimas (peroxidase ou fosfatase alcalina). Embora tenha sido originalmente planejada para a detecção de antígenos (pela ligação específica de anticorpos marcados), a sua maior utilização atual tem sido para detecção de anticorpos (FLORES, 2007).

A técnica baseia-se na imobilização da reação antígeno-anticorpo em um suporte sólido, seguida de uma reação colorimétrica (BRUM; WEIBLEN 2007). Basicamente, os testes de ELISA podem ser classificados em diretos, indiretos e sanduíche (Figura 8).

**Figura 8** - Principais tipos de ELISA.



Fonte: Thermo Scientific, ELISA technical guide and protocols.

Nota: A figura ilustra os principais tipos de ELISA. Ensaio direto, Ensaio indireto e Ensaio sanduíche, sendo este último o ensaio utilizado no presente trabalho.

O ensaio sanduíche usa dois anticorpos diferentes que reagem com epítomos distintos no antígeno, cuja concentração precisa ser determinada. Uma quantidade fixa de um anticorpo é ligada a uma série de suportes sólidos, soluções teste contendo antígeno numa concentração desconhecida, ou uma série de soluções-padrão com concentrações conhecidas do antígeno são adicionados para que ocorra ligação. Os antígenos que não se ligaram são removidos por lavagem, e o segundo anticorpo, acoplado a uma enzima é colocado para que se ligue. Os resultados obtidos nas soluções-padrão são utilizados para a construção de uma curva de

ligação para o segundo anticorpo como uma função da concentração do antígeno, a partir da qual as quantidades de antígeno nas soluções-teste podem ser inferidas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

As principais vantagens do método incluem a especificidade, sensibilidade, rapidez, custo relativamente baixo, praticidade e capacidade de automação. Geralmente produz resultados qualitativos (positivo/negativo), mas pode ser adaptada para uma avaliação semi-quantitativa dos anticorpos. As maiores restrições ao uso da tecnologia de ELISA para diagnóstico se refere a necessidade dos aparelhos para lavagem das placas e para leitura da reação (espectrofotômetro) (FLORES, 2007).

### ***1.9 Sistemas de Gene Repórter***

Sistemas de gene repórter são frequentemente usados para experimentos *in vivo* ou *in vitro* que visem avaliar indiretamente, via expressão de gene repórter, processos fisiológicos ou fisiopatológicos que ocorrem dentro do ambiente celular (MASHIMO *et al.*, 2012; PAULMURUGAN *et al.*, 2011). Essa abordagem permite avaliar o efeito que uma sequência regulatória de um determinado gene - artificialmente inserido à montante de um outro gene, chamado de repórter - exerce sobre o nível de transcrição deste último. Primeiramente, constrói-se um plasmídeo quimérico, contendo a sequência regulatória sob estudo ligada a um gene repórter. O plasmídeo recombinante é então introduzido em um tipo de célula apropriado e, após um período de 24-72 horas, o produto do gene repórter expresso é quantificado ou avaliado. A quantidade de proteína repórter sintetizada sob várias condições ou tratamentos aos quais as células foram submetidas deve refletir a habilidade da sequência regulatória inserida em promover a transcrição. Vários sistemas de gene repórter estão disponíveis atualmente, sendo que os mais amplamente utilizados no estudo da expressão gênica de mamíferos incluem os que codificam enzimas como cloranfenicol acetil-transferase (CAT), luciferase de vaga-lume (*luc*),  $\beta$ -galactosidase bacteriana ( $\beta$ -gal), fosfatase alcalina e proteína fluorescente verde (GFP - *green fluorescent protein*). Cada um apresenta características particulares e algumas limitações (LIN, 2002).

A enzima luciferase, codificada pelo gene *luc*, clonado do vaga-lume (*Photinus pyralis*), catalisa uma reação de bioluminescência que requer a luciferina como substrato, ATP,  $Mg_{2+}$  e  $O_2$ . Na presença desses reagentes e mediante a ação da luciferase presente no

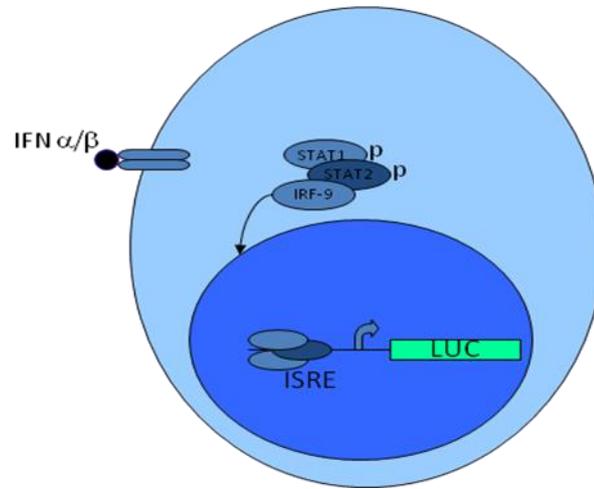
lisado de células, ocorrerá uma reação de oxidação da luciferina com emissão de um *flash* de luz que decai rapidamente. O sinal luminoso é detectado por um luminômetro. A emissão total de luz é proporcional à atividade da luciferase na amostra que, por sua vez, reflete a taxa de transcrição do gene "repórter" sob ação do promotor em estudo (LIN, 2002).

Um uso em particular de sistema de gene repórter tem sido feito em estudos virológicos através da construção de vetores virais expressando gene repórter ou construção de replicons, a fim de se criar ferramentas capazes de contribuir na elucidação das funções das proteínas virais, no esclarecimento de eventos celulares e virais que ocorrem durante a replicação vírus, bem como aumentar o entendimento sobre a patogênese viral e interação sistema imune do hospedeiro-vírus, além de avaliação de terapia antiviral (PATEL, 2012; MEAGER, 2002; SMILOVIĆ *et al.*, 2008).

Sobre a tentativa de esclarecimento da interação sistema imune do hospedeiro-vírus, diversas linhagens celulares expressando gene repórter têm sido desenvolvidas, por exemplo, para estudos envolvendo resposta imune inata à infecção pelo vírus da hepatite C, influenza e vírus do sarampo (NAKAGAWA; SAKAMOTO; ENOMOTO, 2004; DATTA *et al.*, 2011; SHINGAI *et al.*, 2007, SMILOVIĆ *et al.*, 2008).

Com o objetivo de estudar a interação sistema imune vírus-hospedeiro e esclarecer o envolvimento de diferentes cepas do DENV na via de sinalização do IFN-I utilizamos a linhagem celular BHK-21-pISRE-Luc-Hygro, desenvolvida no Departamento de Virologia do CPqAM. Esta linhagem possui em seu genoma o plasmídeo pISRE-Luc-Hygro que tem como promotor o ISRE (região responsiva ao IFN-I) fusionado ao gene repórter luciferase (SILVA, 2010). Através dessa linhagem é possível estudar a ativação da sinalização da via do IFN-I pela mensuração da expressão da luciferase, que só é transcrita após a ativação do promotor ISRE estimulado pela ligação do IFN-I ao seu receptor na superfície celular (Figura 9).

**Figura 9.** Esquema de expressão da luciferase por ativação do promotor ISRE estimulado por IFN-I.



Fonte: Da autora (2010).

Nota: O esquema acima ilustra como o uso da linhagem BHK-21-pISRE-Luc-Hygro foi possível para estudar a ativação da via de sinalização do IFN-I. Após a ativação do promotor ISRE estimulado pela ligação do IFN-I ao seu receptor na superfície celular podemos mensurar a expressão da luciferase.

## 2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos 50 anos a dengue vem progressivamente alcançando o status de pandemia global, hospitalizando mais de 5 milhões de crianças com mais de 70.000 mortes devido à forma mais severa da doença, a FHD. No entanto, apesar do grande impacto na saúde mundial, nem vacinas ou drogas antivirais estão disponíveis atualmente.

Dado o fato de a intensidade de replicação do vírus durante os momentos iniciais da infecção determinar os desfechos clínicos da doença, é importante compreender o impacto da infecção da dengue na imunidade inata. Durante esta fase crítica, os mecanismos inatos antivirais mediados por IFN-I são potencialmente as mais importantes vias de defesa do hospedeiro. A resposta do IFN-I contra o DENV ainda não é bem compreendida e uma clara compreensão da base molecular do antagonismo da resposta do IFN exercido pelo DENV representaria um avanço crítico, além disso, a eficiência com que o DENV escapa a resposta do IFN em humanos é provavelmente um fator importante na replicação viral e, conseqüentemente, na patogênese da doença. Dessa forma, definir os fatores moleculares, responsáveis pela evolução da dengue para sua forma grave e compreender um pouco mais a respeito da resposta imune inata inicial na infecção pelo DENV, possibilitaria o esclarecimento dos mecanismos imunopatológicos causados por esse vírus, permitindo o desenvolvimento de drogas, vacinas atenuadas, estratégias terapêuticas e métodos diagnósticos eficazes para pacientes de alto risco reduzindo assim a mortalidade causada pela doença.

### **3 PERGUNTA CONDUTORA**

Qual o papel do interferon do tipo I na infecção pelo vírus da dengue?

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Estudar a participação do IFN-I na infecção pelo DENV.

### **4.2 Objetivos específicos**

- a) Quantificar, por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), o nível de expressão dos genes IFN  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  em PBMCs de pacientes infectados pelo DENV;
- b) Quantificar os níveis de IFN-I no soro de pacientes infectados DENV através do ensaio imunoenzimático ELISA;
- c) Correlacionar os resultados das análises de qPCR e ELISA obtidas a partir de amostras dos pacientes analisados no estudo;
- d) Cultivar e titular cepas virais do DENV isolados no estado de Pernambuco, Brasil;
- e) Analisar a inibição da via de sinalização do IFN-I pelos diferentes isolados do DENV utilizados no estudo.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Seleção das amostras

O Departamento de Virologia e Terapia Experimental, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)/FIOCRUZ, realizou um estudo de coorte, descrito por Cordeiro e colaboradores (2007) (CORDEIRO et al., 2007b), composto por pacientes voluntários com FD e FHD da cidade do Recife, estado de Pernambuco. O projeto da coorte foi revisado e aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães CEP – CPqAM (número 32/09, documento em anexo). Os voluntários da coorte foram cadastrados na pesquisa quando diagnosticados com dengue nos hospitais participantes do estudo (Hospitais Santa Joana, Esperança, Instituto Materno Infantil de Pernambuco, Barão de Lucena e Oswaldo Cruz). Esses voluntários foram examinados do primeiro ao quarto dia de detecção da doença, com avaliações adicionais a cada 24-48 horas, dependendo do estado clínico dos pacientes. A cada voluntário foi solicitada uma doação de 4 a 5 amostras de sangue, dos dias 1º ao 30º após o início dos sintomas.

A caracterização clínica incluiu a história e avaliação clínica, hemograma, contagem de plaquetas, enzimas hepáticas, sorologia para dengue por ELISA-IgM (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) e ELISA-IgG (PANBIO), isolamento viral em células de *Aedes albopictus* linhagem C6/36, e diagnóstico molecular de dengue por RT-PCR viral. Cada voluntário e respectiva amostra recebeu uma numeração, sendo os dados introduzidos em um sistema digital, em tempo real, através de uma interface sem fio, e validados dentro de 24 horas. As informações foram integradas a um banco de dados que incluiu os dados clínicos completos, resultados de pesquisa e o respectivo inventário de amostras de PBMCs congeladas (CORDEIRO et al., 2007b).

Este trabalho conta com uma população teste composta de 59 amostras de PBMCs e 42 amostras de soro. As amostras de PBMCs foram coletadas durante 3 a 5, 6 a 10 e 11 a 30 dias do início da febre, das quais 28 são de indivíduos que tiveram FD, 26 FHD e 5 de indivíduos saudáveis (negativos para dengue). Já as amostras de soro, desses mesmo pacientes, que foram utilizadas no estudo, foram coletadas durante 3 a 5 dias de febre, das quais 22 são de indivíduos que tiveram FD e 20 FHD.

## **5.2 Preparo das amostras celulares**

Para obter as PBMCs, o sangue total do paciente, coletado em heparina, foi diluído em solução salina na proporção de 1:2 (v/v). Em seguida, o volume total dessa amostra diluída foi colocado em tubo estéril contendo solução de Ficoll-Hypaque ( $d=1.007$  g/L) (Amersham, Biosciences) em um volume igual ao volume de sangue utilizado e submetido à centrifugação a 2500 rpm/20°C. Após 25 minutos as PBMCs foram recuperadas com uso de pipetas Pasteur estéreis, na interface entre a solução salina e a solução de Ficoll. As células obtidas foram então submetidas a três procedimentos de lavagem com meio de cultura de RPMI 1640 (Sigma Co.), quantificadas automaticamente por contador de células (*Vi-cell XR* - Beckman Coulter), armazenadas e congeladas em 10% (v/v) de DMSO a - 80°C até o momento do uso.

## **5.3 Purificação de RNA total de PBMCs**

A purificação de RNA total de PBMCs foi realizada através do kit “*Invisorb spin cell RNA mini kit for total RNA extractions from animal and human cells*” (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram descongeladas e centrifugadas por 5 minutos a 1.500 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi completamente descartado. Ao pellet de células foram adicionados 350µL da solução de lise (já com o DTT 1M). Todo o volume foi então adicionado diretamente à coluna para remoção de DNA genômico, incubado durante 1 minuto e centrifugado por 2 minutos a 12.000 rpm. Após a centrifugação a coluna foi descartada e foram adicionados 350µL de etanol 70% ao o tubo coletor. Esse volume foi então adicionado a uma coluna de RNA, incubado por 1 minuto e centrifugado por 30 segundos a 10.000 rpm. Em seguida, 600µL do tampão de lavagem R1 foram adicionados a coluna e esta foi submetida a centrifugação (30 segundos a 10.000 rpm). Posteriormente, 700µL do tampão de lavagem R2 foram pipetados na coluna e o material foi novamente submetido a centrifugação (30 segundos a 10.000 rpm). Para eliminar traços de etanol, utilizado nas lavagens, o material foi centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. O tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para um tubo livre de RNase. Entre 40µL a 60µL do tampão de eluição foi pipetado diretamente na coluna. Os tubos foram incubados por 2 minutos e centrifugados por 1 minuto a 10.000 rpm. Após a centrifugação, a concentração do

RNA purificado foi dosada por espectrofotometria e, em seguida o RNA foi armazenado a - 80°C até o momento do uso.

#### **5.4 RT- PCR**

O RNA extraído foi transcrito reversamente utilizando-se a enzima “*Superscript III reverse transcriptase*” 200U/ $\mu$ L (Invitrogen), iniciadores randômicos hexâmeros (Invitrogen) e inibidor de RNase (*RNAse OUT* 40 U/ $\mu$ L - Invitrogen), segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante dos reagentes. O cDNA produzido após essa reação foi mantido a - 20°C até o momento do uso.

#### **5.5 PCR quantitativa em tempo real**

Foram utilizadas sondas específicas para os genes que codificam os IFNs  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ , do tipo MGB marcadas com o corante fluorescente FAM, o gene da beta actina como gene constitutivo (controle endógeno) marcado com o corante VIC e a fluorescência normalizadora da reação foi feita pelo corante ROX. As reações foram feitas utilizando-se kits de amplificação baseados no sistema de sondas TaqMan (Applied Biosystems). As reações de qPCR foram realizadas em duplicatas seguindo-se as orientações padrão otimizadas para o equipamento *ABI Prism 7500* (Applied Biosystems), instalado no NPT 1 do CPqAM/FIOCRUZ. Os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software ABI PRISM* (versão 1.4 - Applied Biosystems) pelo método  $\Delta\Delta$ Ct. Todos os gráficos foram construídos utilizando-se o *software Prism* (4.0). Os valores apresentados foram relativizados com a média dos valores obtidos para as amostras dos cinco indivíduos negativos para dengue (controle).

#### **5.6 Preparo das amostras sorológicas**

Para obtenção das amostras de soro, o sangue total dos pacientes foi centrifugado a 2500 rpm/20°C por 15 minutos. Em seguida, os soros foram armazenados e congelados a - 80°C até o momento do uso.

### 5.7 Determinação dos níveis séricos do IFN- $\alpha$ por ELISA

Os níveis de IFN  $\alpha$  foram quantificados através do “*Human  $\alpha$  Interferon ( $\alpha$  IFN) Elisa kit*” (BioSource), de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados a cada poço da placa sensibilizada 50 $\mu$ L do soro de cada paciente, o padrão IFN- $\alpha$  humano em diferentes concentrações (50, 100, 250 e 500 pg/mL), o branco (PBS 1x) e 100 $\mu$ L do anticorpo conjugado a enzima, em seguida a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Após a incubação a placa foi lavada 5 vezes com o tampão de lavagem, foram adicionados 50 $\mu$ L da solução substrato A e 50 $\mu$ L da solução substrato B a cada poço e a placa foi incubada a 37°C por 15 minutos sob a proteção da luz. Quinze minutos depois foram adicionados 50 $\mu$ L de solução parada a cada poço e foi realizada a leitura da absorbância (densidade ótica de 450nm) das amostras através do espectrofotômetro (*Benchmark Plus microplate spectrophotometer* - BIO-RAD).

Os níveis de IFN- $\beta$  foram quantificados através do “*VeriKine-HS<sup>TM</sup> Human IFN- $\beta$  Serum ELISA kit*” (pbl interferon source), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram adicionados à placa sensibilizada 50 $\mu$ L do tampão da amostra, 50 $\mu$ L da solução do anticorpo diluído, 50 $\mu$ L do soro de cada paciente ou 50 $\mu$ L da diluição seriada do padrão IFN- $\beta$  humano (1.2, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5 e 75 pg/mL) ou 50 $\mu$ L do branco (diluinte padrão), em seguida a placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Após a incubação a placa foi lavada 3 vezes com o tampão de lavagem, foram adicionados 100 $\mu$ L da solução HRP diluída a cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Trinta minutos depois a placa foi lavada 4 vezes, foram adicionados 100 $\mu$ L da solução substrato TMB a cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 60 minutos sob a proteção da luz. Após os 60 minutos de incubação foram adicionados 100 $\mu$ L da solução parada a cada poço e foi realizada a leitura da absorbância (densidade ótica 450nm) das amostras através do espectrofotômetro (*Benchmark Plus microplate spectrophotometer* - BIO-RAD).

### 5.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos através da quantificação da expressão dos genes que codificam para os IFNs  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , por qPCR, foram analisados e plotados usando teste t não pareado (95% C.I.) com correção de Welch, realizados utilizando *GraphPad Prism* versão 4.0a para Macintosh

OS X (*GraphPad Software*) e os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Equanto os resultados obtidos da quantificação dos níveis séricos de IFN-I, por ELISA, foram analisados estatisticamente pelo teste t não paramétrico e os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **5.9 Cultivo de células**

Células de *Aedes albopictus* linhagem C6/36 foram mantidas em meio de cultura L-15 suplementado com 5% soro bovino fetal a 28°C. Células BHK-21-pISRE-Luc-Hygro, recentemente desenvolvida no Departamento de Virologia do CPqAM, foram mantidas em meio MEM suplementado com 10% soro bovino fetal, 1% de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina) e 300µg de Higromicina/mL a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os estoques de células foram mantidos a -80°C.

### **5.10 Cultivo de vírus**

Foram utilizados 8 diferentes cepas do DENV isolados de pacientes infectados em Pernambuco, Brasil. Os vírus são oriundos das coleções de vírus do LACEN-PE e do Departamento de Virologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães. Cada estoque viral foi crescido, a partir da segunda passagem, em uma garrafa T25, passada para T75 e, em seguida, para 6 garrafas T150 semeadas com 10<sup>6</sup>, 5x10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> células, respectivamente, de *Aedes albopictus* linhagem C6/36 e após a observação do efeito citopático induzido pelos vírus, os sobrenadantes foram coletados, suplementados com 20% de soro bovino fetal e armazenados em alíquotas de 1 mL a -80°C.

#### **5.10.1 Concentração viral**

Cerca de 180 mL dos sobrenadantes de cada isolado do DENV (passagens de 4 a 6), derivados do cultivo de 6 garrafas T150, foram submetidos a ultracentrifugação, através da ultracentrífuga refrigerada *Beckman Coulter Optima LE-80k*, por um período de quatro horas

a 28.000 rpm e 8°C, utilizando o rotor 28SW. Após a ultracentrifugação os sobrenadantes foram descartados, o pellet viral foi ressuscitado em 1,8 mL de meio L-15 suplementado com 2% de soro fetal bovino e 1 mM de HEPES e armazenados em alíquotas de 200 µL a -80°C. Alíquotas de 10 µL foram separadas para titulação viral.

### 5.10.2 Titulação viral

Os vírus foram titulados por ensaio de placa em células de *Aedes albopictus* linhagem C6/36. Brevemente, uma concentração de  $2,0-3,0 \times 10^5$  células/poço foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas a 28°C para formação da monocamada. Vinte e quatro horas após a preparação das placas as monocamadas de células foram inoculadas com 6 diluições em série de vírus em um volume final de 200µL (as infecções são realizadas em duplicatas). Após o período de incubação de 1 hora, que corresponde ao tempo de adsorção do vírus, foi adicionado 1mL de meio semi-sólido a cada poço e as placas foram incubadas por 5 dias a 28°C. Após os cinco dias de incubação, o meio semi-sólido foi retirado e as células foram lavadas 1 vez com PBS 1X e fixadas com acetona 30% durante 13 minutos a 4°C. Após a fixação das células, estas foram lavadas mais uma vez com PBS 1X e, em seguida, incubadas a 28°C por um período de 24 horas para completa secagem dos poços. Após o período de secagem, 200µL do anticorpo primário policlonal, produzido contra flavivírus do grupo B, cedido gentilmente pelo Dr. Pedro Vasconcelos, Instituto Evandro Chagas, Belém – PA, diluído (1:100) em tampão de ligação foi adicionado a cada poço. Após incubação das placas por 1 hora a 37°C, as células foram lavadas 3 vezes com o tampão de lavagem (PBS-Tween 0,05%) e o anticorpo secundário (200 µL), *HRP-rec-protein G* (Invitrogen), diluído (1:500) em tampão de ligação foi adicionado. Após 1 hora incubação, do anticorpo secundário a 37°C, as células foram lavadas novamente e foram adicionados 500 µL do substrato AEC a cada poço. As placas foram, então, incubadas durante 30 minutos a 37° sob a proteção da luz. Após os 30 minutos de incubação, o substrato foi descartado e os poços foram lavados uma vez com PBS 1x para retirar o excesso de substrato e parar a reação. Após secagem dos poços em estufa foi feita a contagem das placas.

### ***5.11 Estudo da via de sinalização do IFN-I em células infectadas com diferentes cepas isoladas do DENV***

Para o estudo da via de sinalização do IFN-I,  $2 \times 10^4$  células da linhagem BHK-21-pISRE-Luc-Hygro clone 1 por poço foram semeadas em placas de 96 poços (em duplicata) e após 24 horas foram infectadas em duplicata (MOI - Multiplicity of infection de 1) com as diferentes cepas do DENV. Trinta e seis horas após a infecção foram tratadas ou não (controle negativo – células não tratadas) com 2.000 UI/mL de IFN  $\alpha$ . Essas células foram incubadas oito horas a 37°C em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> e a expressão do gene repórter luciferase foi avaliada. Para isso, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e então foi realizada a lise celular com 50  $\mu$ L do reagente de lise 1X, cell culture lysis reagent (Promega). Em seguida, as soluções foram centrifugadas e 50  $\mu$ L do sobrenadante foram transferidos para uma placa branca de 96 poços. A cada lisado foi adicionado 100  $\mu$ L do substrato luciferina (Promega) na efetuação da leitura. A mensuração da atividade da luciferase foi realizada através do luminômetro (Mithras LB 940 - Berthold).

### ***5.12 Considerações Éticas***

Este projeto de pesquisa faz parte de um projeto maior que tem como objetivo estudar os mecanismos imunopatológicos do vírus da dengue, o qual teve a aprovação da Comissão em Ética em Pesquisas do CPqAM/ FIOCRUZ, em 25 de setembro de 2009, Registro 32/09, CAAE 0030.0.095.000-09, de acordo com a Resolução CNS 196/96 (documento em anexo).

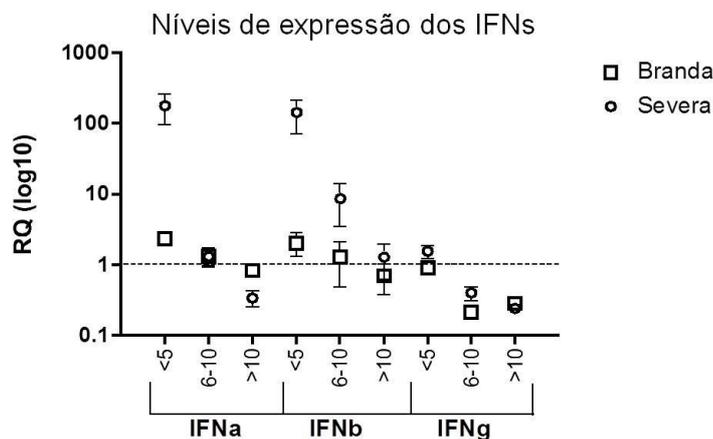
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Quantificação da expressão dos genes IFN $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ por qPCR

Visando comparar os níveis de expressão dos genes que codificam os IFNs  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  nos primeiros alvos celulares do DENV, PBMCs obtidas a partir de amostras de sangue de pacientes acometidos por FD e FHD tiveram, inicialmente, os níveis de expressão do mRNA que codifica para tais genes quantificados através da qPCR.

O Gráfico 1 representa a comparação entre os níveis de expressão dos genes testados em PBMCs de pacientes infectados pelo DENV em amostras obtidas durante 3 a 5, 6 a 10 e 11 a 30 dias do início da febre. Pode-se observar que os níveis de expressão do IFN  $\gamma$  não são significativamente alterados pela infecção pelo DENV em todos os períodos analisados no presente estudo. É possível observar, também, que os pacientes acometidos com a forma grave da dengue (FHD), com até 5 dias de febre, expressaram níveis mais elevados do IFN-I ( $\alpha/\beta$ ) quando comparados aos pacientes acometidos pela forma branda da doença (FD).

**Gráfico 1** - Determinação dos níveis de transcritos do IFNs medidos por RT-PCR usando PBMC de pacientes infectados pelo DENV.



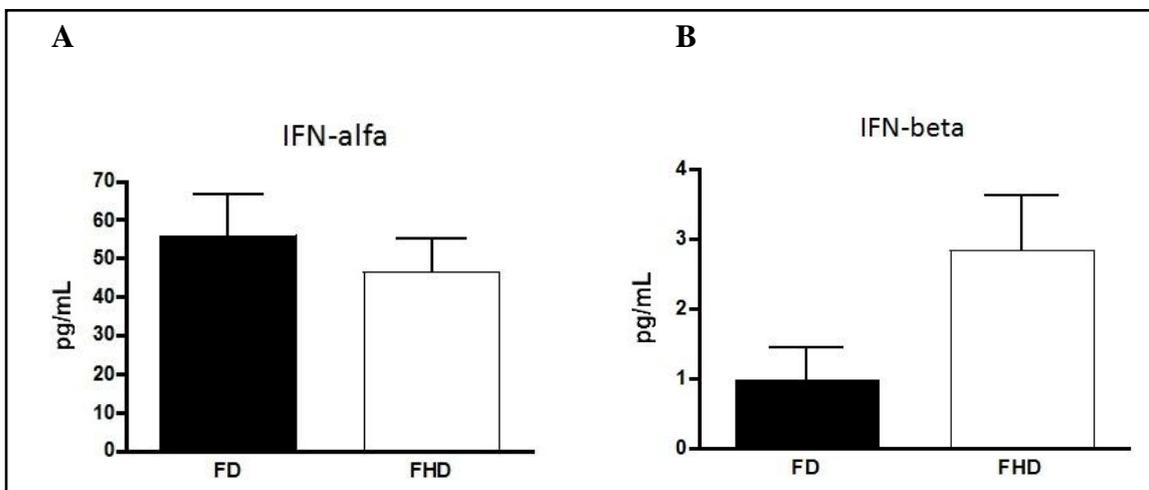
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Cada ponto representa a média dos níveis de mRNA para IFNs de pacientes individualmente testados na fase aguda da doença. ○ = Severa (pacientes FHD) e □ = Branda (pacientes FD).

## 6.2 Determinação dos níveis séricos do IFN-I por ELISA

Diante da importância do IFN-I na resposta imune antiviral, nos propomos a verificar os níveis séricos do IFN-I ( $\alpha$  e  $\beta$ ) utilizando os soros de pacientes na fase aguda de sintomas ( $\leq 5$  dias de febre), pois, como demonstrado no Gráfico 1, apenas neste período foi observada uma diferença significativa entre os níveis de mRNA para IFN-I em PBMCs de pacientes acometidos com as formas branda e grave da dengue. A quantificação do IFN-I no soro foi feita através da técnica de ELISA e os resultados estão apresentados no Gráfico 2.

**Gráfico 2.** Níveis séricos do IFN-I em pacientes na fase aguda da infecção pelo dengue.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Níveis dos IFN- $\alpha$  (A) e IFN- $\beta$  (B) em soro de pacientes infectados pelo DENV na fase aguda da infecção ( $\leq 5$  dias de febre), medidos por ELISA. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão pg/mL (A), pg/mL (B). As amostras foram analisadas estatisticamente pelo *t test* ( $p < 0,05$ ). FD: Febre da Dengue; FHD: Febre Hemorrágica da Dengue (FD n= 22. FHD n= 20).

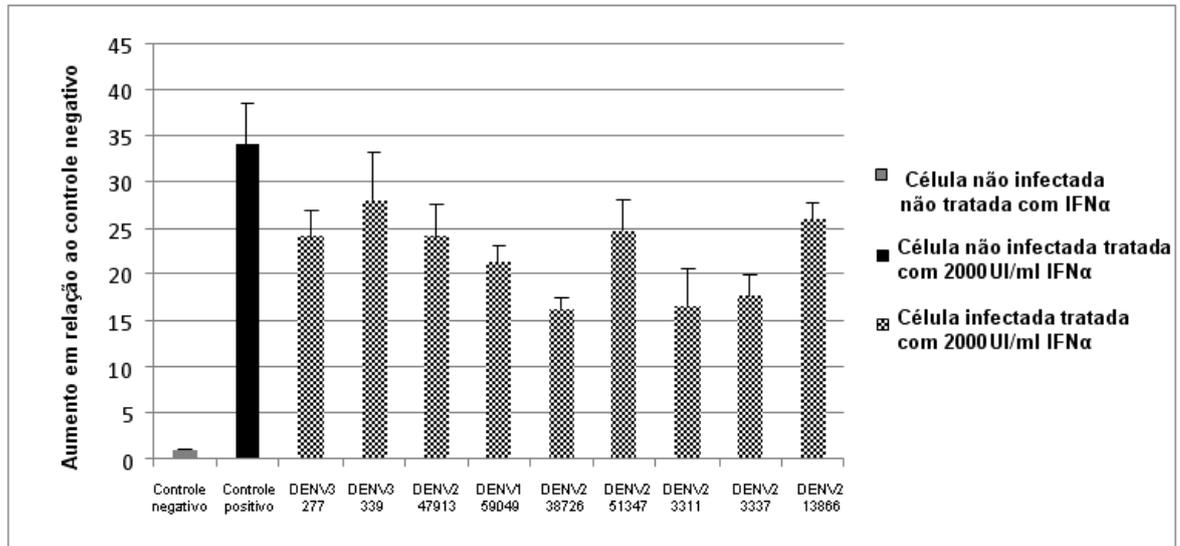
Os níveis séricos em pg/mL de IFN- $\alpha$  produzidos tanto nos pacientes FD quanto FHD foram maiores que os de IFN- $\beta$ . Analisando os níveis séricos de IFN- $\alpha$  pode-se observar que são similares nos dois tipos clínicos avaliados da doença, estando ligeiramente aumentados nos pacientes acometidos de FD em relação aos pacientes com FHD, representando um padrão diferente do observado nos transcritos de IFN- $\alpha$  em PBMCs (Gráfico 1), porém sem significado estatístico. No entanto, os níveis séricos de IFN- $\beta$  mostraram-se mais elevados, com significado estatístico ( $p=0,0426$ ), nos pacientes FHD em relação aos pacientes FD, corroborando com o resultado obtido através da qPCR.

### ***6.3 Estudo da via de sinalização do IFN-I em células infectadas com diferentes cepas isoladas do DENV***

Visando estudar a ativação da via de sinalização do IFN-I pela mensuração da expressão da luciferase, células da linhagem BHK-21-pISRE-Luc-Hygro clone 1, que possuem o promotor o ISRE (responsivo ao IFN-I) fusionado a esse gene repórter, foram infectadas com 9 diferentes cepas de 3 sorotipos do DENV com o MOI de 1 e tratadas ou não (controle negativo – células não tratadas) com 2.000 UI/mL de IFN  $\alpha$ .

De acordo com o Gráfico 3 podemos observar que as células não infectadas e não tratadas com IFN- $\alpha$  (controle negativo) não mostraram níveis significativos de expressão da luciferase. Ao contrário, as células não infectadas e tratadas com IFN- $\alpha$  (controle positivo tratado com IFN- $\alpha$ ) tiveram os mais altos níveis de expressão de luciferase comparado tanto às células infectadas e tratadas com IFN- $\alpha$  como também ao controle negativo não tratado. Ao analisarmos as células infectadas com as diferentes cepas do DENV podemos observar que todos os vírus utilizados foram capazes de inibir, em diferentes proporções, a expressão da luciferase e conseqüentemente de IFN- $\alpha$ .

**Gráfico 3-** Atividade da luciferase em células da linhagem BHK-21pISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas de três sorotipos do DENV e tratadas, durante 8 horas, com 2000 UI/mL de IFN- $\alpha$ , em relação ao controle negativo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Controle negativo = células BHK-21pISRE-Luc-Hygro não infectadas e não estimuladas com IFN- $\alpha$ ; Controle positivo = células BHK-21pISRE-Luc-Hygro não infectadas e estimuladas com 2000 UI/mL de IFN- $\alpha$ ; Células infectadas estimuladas com 2000UI/mL de IFN- $\alpha$  = células BHK-21pISRE-Luc-Hygro infectadas com diferentes cepas e sorotipos do DENV e estimuladas 8 horas com 2000 UI/mL de IFN- $\alpha$ , dados expressos em relação ao controle negativo.

## 7 DISCUSSÃO

O IFN-I é a principal citocina na resposta imune as infecções virais, sendo secretado após o reconhecimento de vírus de RNA, como é o caso do DENV, através de receptores presentes no citoplasma celular, tais como receptores semelhantes ao RIG-I e MDA5, os TLRs 3,7 e 8 ou, ainda, o PKR. Esse reconhecimento ativa uma cascata de sinal no citoplasma celular que leva a ativação e subsequente migração para o núcleo celular dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B ou IRFs 3 e 7, resultando na transcrição dos genes para produção do IFN-I (BIRON; SEM, 2007; KOYAMA *et al.*, 2008; BAUM; GARCIA-SASTRE, 2010). O IFN-I secretado agirá sobre as células vizinhas àquela infectada, induzindo nestas a transcrição de proteínas com atividade antiviral, conferindo assim proteção à infecção viral, restringindo a propagação do vírus (SAMUEL, 2001).

O DENV é um patógeno humano, que infecta produtivamente uma grande variedade de células envolvidas na resposta imune. Não está totalmente esclarecido se os monócitos e macrófagos seriam alvos iniciais para o DENV, no entanto, tem sido demonstrado que o DENV replica em monócitos, macrófagos, células B, células dendríticas (DCs), entre outros (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012). As células dendríticas apresentam papel importante nas respostas imune inata e adaptativa a organismos infecciosos. Dentre os tipos de DCs, as células dendríticas plasmocíticas (pDCs) e mielóides (mDCs) são instrumentos fundamentais na resposta imunológica inata aos vírus. As pDCs são especializadas na produção de IFN-I e representam a principal fonte de IFN nos humanos (MCKENNA, BEIGNON, BHARDWAJ, 2005).

No presente trabalho utilizamos PBMCs para analisar a quantidade de mRNA que codifica para os IFNs-I e II produzidos pelos pacientes infectados com dengue na fase aguda da doença. Dados de Morrison e colaboradores mostram que todas as PBMCs são capazes de ser infectadas pelo DENV e produzir partículas infecciosas, mas com diferentes cinéticas de infecção, sugerindo uma hierarquia e cronologia específicas de infecção das diferentes células nos seres humanos (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012). Nossos resultados (gráfico 1) mostraram que os pacientes acometidos com a forma grave da dengue (FHD), na fase aguda ( $\leq 5$  dias de febre), expressaram níveis mais elevados do IFN-I ( $\alpha/\beta$ ) quando comparados aos pacientes acometidos pela forma branda da doença (FD). Enquanto

os níveis de expressão do IFN- $\gamma$  não foram significativamente alterados pela infecção pelo DENV em todos os períodos analisados no estudo.

A descoberta de níveis elevados de citocinas durante a fase aguda em comparação a fase de convalescência da dengue sugere seu envolvimento na patogênese da infecção (RESTREPO *et al.*, 2008). Foram descritas altas concentrações de IFN- $\alpha$  tanto em pacientes com FHD quanto com FD, porém seu papel na gravidade da doença ainda não foi totalmente elucidado (KURANE *et al.*, 1993). O IFN- $\alpha$  é uma citocina que induz resistência aos vírus por ativar vias intracelulares não citolíticas que limitam a dispersão viral e atenuam a infecção (GRANDVAUX *et al.*, 2002). Diamond e colaboradores (2000) demonstraram que os IFN- $\alpha$  e - $\beta$  podem proteger células contra infecção pelo DENV *in vitro* (DIAMOND *et al.*, 2000). Contrariando a hipótese do papel protetor do IFN  $\alpha$ , pesquisadores demonstraram que o DENV escapa do sistema imunológico através da inibição da via do IFN- $\alpha$  (LIN *et al.*, 2004; FOY *et al.*, 2005). Jones e colaboradores indicam que o DENV inibe a ação do IFN- $\alpha$  e não do IFN- $\gamma$ , através da diminuição da expressão do STAT2 (JONES *et al.*, 2005), sendo esses resultados encontrados também por outros autores (HO *et al.*, 2005).

Uma vez que o nosso estudo revelou que os níveis de mRNA do IFN-I estão diferencialmente expressos nos tipos clínicos da dengue, na fase aguda, espera-se que com o aumento da coorte de pacientes e a reavaliação dos resultados, os nossos achados possam contribuir para o estudo imunopatológico da FHD. Além disso, as PBMCs são um subconjunto de células e um estudo adicional utilizando um subconjunto purificado de células, como as DCs, que são os instrumentos fundamentais na resposta imunológica inata aos vírus, diminuiria um possível viés desse estudo. Outra limitação seria o uso de PBMCs *ex vivo* neste estudo, no entanto, resultados de um estudo de Hibberd e colaboradores com PBMCs *in vivo* e *ex vivo* mostraram significativa similaridade (HIBBERD *et al.*, 2006).

Propomos também, no presente trabalho, verificar os níveis séricos do IFN-I, através do ELISA, utilizando os soros dos mesmos pacientes anteriormente citados (pacientes com  $\leq 5$  dias de febre). Os pacientes com sintomas agudos da doença foram escolhidos, pois como visto no gráfico 1, apenas neste período foi observada uma diferença significativa entre os níveis de mRNA para IFN-I em PBMCs dos pacientes acometidos com as formas branda e grave da dengue. No entanto, analisando os níveis séricos de IFN- $\alpha$ , no gráfico 2, um padrão diferente do observado nos transcritos de IFN- $\alpha$  em PBMCs (gráfico 1) foi visto. Observamos

no gráfico 2 que os níveis séricos de IFN- $\alpha$  são similares nos dois tipos clínicos avaliados da doença, estando ligeiramente aumentados nos pacientes acometidos de FD em relação aos pacientes com FHD, mas sem significado estatístico. Os níveis séricos de IFN- $\beta$ , entretanto, mostraram-se mais elevados, com significado estatístico ( $p=0,0426$ ), nos pacientes FHD em relação aos pacientes FD, confirmando o resultado obtido através da qPCR.

Diferente do resultado encontrado no presente trabalho, Ubol *et al.* encontraram correlação entre os níveis de 4 genes quantificados por qPCR através da quantificação de seus produtos por ELISA. Para validar os dados obtidos com o cDNA com o nível das proteínas, os níveis de properdina, IFN- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES e IL-8 no plasma de pacientes com FD ou FHD foram quantificados por ELISA. Os níveis dessas proteínas em pacientes com FHD eram mais elevados do que nos pacientes FD, enquanto nível de IFN- $\alpha$  foi significativamente maior em pacientes com FD. Em conjunto, estes dados indicam que o nível de expressão dos genes e os produtos dos genes foram correlacionados com os dados de microarranjos de cDNA (UBOL *et al.*, 2008).

Uma explicação para as diferenças encontradas entre os níveis de mRNA e de proteínas solúveis podem ser devido a limitação da técnica e do limitado número de amostras utilizados.

Por último, no presente trabalho, com o objetivo de esclarecer o envolvimento de diferentes cepas do DENV na via de sinalização do IFN-I utilizamos a linhagem celular BHK-21-pISRE-Luc-Hygro, que possui em seu genoma o plasmídeo pISRE-Luc-Hygro que tem como promotor o ISRE (região responsiva ao IFN-I) fusionado ao gene repórter luciferase, sendo possível estudar a ativação da sinalização da via do IFN-I pela mensuração da expressão desse gene repórter, que só é transcrito após a ativação do promotor ISRE estimulado pela ligação do IFN-I ao seu receptor na superfície celular.

Vários sistemas de gene repórter estão disponíveis atualmente, sendo que os mais utilizados no estudo da expressão gênica de mamíferos incluem os que codificam enzimas como CAT,  $\beta$ -gal, fosfatase alcalina, GFP e a luciferase firefly. Cada um apresenta características particulares e algumas limitações (LIN, 2002). No nosso trabalho utilizamos a luciferase firefly pelo fato de o plasmídeo já construído ter a sequência desse gene repórter fusionado ao promotor de interesse responsivo ao IFN-I. Além disso, o uso desse gene

repórter já está bem estabelecido no nosso laboratório, ou seja, não foi preciso adquirir os reagentes (solução de lise e substrato da enzima) e equipamentos (luminômetro) necessários para sua mensuração, uma vez que o uso dessa técnica já estava bem padronizada.

Os resultados observados no Gráfico 3 mostraram que as células BHK-21-pISRE-Luc-Hygro clone 1 não infectadas e não tratadas com IFN- $\alpha$  (controle negativo) não mostraram níveis significativos de expressão da luciferase, enquanto as células BHK-21-pISRE-Luc-Hygro clone 1 não infectadas e tratadas com IFN- $\alpha$  (controle positivo, células não infectadas e estimuladas com IFN- $\alpha$ ) tiveram os mais altos níveis de expressão de luciferase. Esse resultado era esperado, devido essas células repórteres serem células da linhagem BHK-21, que não são capazes de expressar o IFN-I. Assim quando tratadas com IFN- $\alpha$  expressam altos níveis de luciferase.

Ao analisarmos as células BHK-21-pISRE-Luc-Hygro clone 1 infectadas com as diferentes cepas do DENV podemos observar que todos os vírus utilizados foram capazes de inibir a expressão da luciferase e conseqüentemente de IFN- $\alpha$  e que cada vírus inibiu em diferentes proporções. Assim como no estudo de Umareddy e colaboradores, no qual também foram utilizados isolados clínicos, nesse caso 4 isolados de pacientes DF, sendo um DENV-1, dois DENV-2 e um DENV-4, foi observado que as diferentes cepas do DENV respondem diferentemente ao IFN-I (UMAREDDY *et al.*, 2008).

Sabe-se que para infectar os seres humanos de forma eficiente o DENV deve evitar ou inibir elementos fundamentais do sistema imunológico inato do hospedeiro, ou seja, a resposta do IFN-I. Além disso, também é sabido que o DENV consegue inibir duas etapas fundamentais da resposta imune inata, tanto a indução/produção como a sinalização do IFN-I, reduzindo a expressão de centenas de genes induzíveis por IFN que iriam estabelecer o estado antiviral e controlar a propagação da infecção no hospedeiro (AGUIRRE *et al.*, 2012). Recentemente, diversos trabalhos têm associado à patogenicidade do DENV com a capacidade do vírus em inibir a resposta do IFN-I, porém vários destes dados são contraditórios e necessitam melhores esclarecimentos (MAZZON *et al.*, 2009; JONES *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-MADOZ *et al.*, 2010), principalmente no que diz respeito ao tipo de cepa utilizada (UMAREDDY *et al.*, 2008), aparentemente cepas isoladas de paciente respondem diferentemente das cepas de laboratório, as quais já estão adaptadas ao cultivo celular *in vitro*.

De acordo com nossos resultados podemos também observar que as diferentes cepas do DENV-2 foram as que mais tiveram capacidade de inibir a sinalização do IFN-I. Ao longo dos experimentos foi observado que o sorotipo 2 do DENV apresentou maior quantidade e mais rápido efeito citopático (cerca de 4 dias, enquanto os DENV-1 e -3 apresentaram efeito entre 6 a 7 dias). Essa característica de replicar mais rapidamente nas células observada no DENV-2 poderia justificar sua maior capacidade em inibir a via de sinalização do IFN-I em relação aos outros sorotipos estudados.

Por fim, este trabalho mostrou que para o total esclarecimento dos mecanismos imunopatológicos causados pelo DENV é importante definir os fatores moleculares, responsáveis pela evolução da dengue para sua forma grave e compreender um pouco mais sobre a resposta imune inata na infecção pelo DENV e as formas com que esse vírus faz para evadir a resposta via IFN-I, causando a doença.

## 8 CONCLUSÕES

Com os trabalhos desenvolvidos neste presente estudo pode-se concluir que:

- a) IFN  $\gamma$  não tem sua expressão significativamente alterada em PBMC de pacientes infectados pelo DENV;
- b) IFN-I tem sua expressão elevada em pacientes infectados pelo DENV (fase aguda) e é significativamente mais expresso naqueles que desenvolveram FHD;
- c) Os altos níveis de expressão do IFN-I no início da infecção, em pacientes com FHD, podem estar associados ao desenvolvimento da forma severa da dengue;
- d) Os níveis séricos de IFN- $\alpha$  são similares estando ligeiramente aumentados nos pacientes acometidos de FD em relação aos pacientes com FHD;
- e) Os níveis séricos de IFN- $\beta$  são maiores em pacientes que desenvolveram a FHD;
- f) Os diferentes sorotipos e cepas do DENV são capazes de inibir, em diferentes proporções, a via de sinalização do IFN-I.

## 9 PERPECTIVAS

Quantificar o IFN-I em um maior número de amostras de PBMCs e soro de pacientes infectados pelo DENV através da qPCR e do ELISA, respectivamente, e estudar a via de indução do IFN-I por diferentes cepas de DENV isolados no Brasil, utilizando a linhagem de células BHK-21-pISRE-Luc-Hygro, procurando acrescentar conhecimentos sobre a resposta imune inata inicial após a infecção pelo DENV, especialmente a resposta do IFN-I, e desse modo contribuir para o esclarecimento dos mecanismos imunopatológicos causados por este vírus.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Propriedades gerais das respostas imunes. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 7 ed. Saunders: Elsevier, 2012, p. 1-14.
- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Imunidade Inata. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 7 ed. Saunders: Elsevier, 2012, p. 55-88.
- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Técnicas de laboratório comumente utilizadas em imunologia. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 7 ed. Saunders: Elsevier, 2012, p. 513-525.
- AGGARWAL, A. *et al.* An epidemic of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome in children in Delhi. **Indian Pediatric**, New Delhi, v. 35, p. 727-732, 1998.
- AGUIRRE, S. *et al.* DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Human STING. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 8, p. 1-14, 2012.
- ALMEIDA, P.; SADDI, V. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real, **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, São Paulo, v.29, p. 382-386, 2007.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Guetting Started Guide: Relative Quantification Applied biosystems 7300/7500 Real time PCR system**. Foster City, 2004.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I. *et al.* Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection, **Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 24, p. 218-228, 2010.
- BARTENSCLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Microbiology**, London, v. 3, p. 155-165, 2008.
- BARATA, E. *et al.* *Aedes aegypti* (*l.*) population in an endemic area of dengue in the Southeast Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, p 237-242, 2001.
- BAUM, A.; GARCIA-SASTRE, A. Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates, **Amino acids**, New York, v. 5, p. 1283-1299, 2010.
- BIRON, C.; SEM, G. Innate Response to viral infections In: Fields, B.N.D.M.; Kinipe, P.M. **Fields Virology**, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 5. ed., 2007, c. 9, p. 249-271.
- BHAMARAPRAVATI, N.; YOKSAN, S. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.) **Dengue and dengue hemorrhagic fever**, New York: CAB International, 1997, p. 367-376.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. 2. ed. Brasília, DF: Ed. do Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. 3 ed. Brasília, DF: Ed. do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7 ed. Brasília, DF: Ed. do Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A dengue no Brasil**. Cartilha dengue, 2010. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha\\_dengue.html](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html)> Acesso em: 2 abr. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Balanco da dengue**, janeiro a abril de 2012. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/ap\\_balnco\\_dengue.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/ap_balnco_dengue.pdf)> Acesso em: 24 abr. 2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância. **Saúde repassa R\$ 8,5 milhões para combate à dengue em Pernambuco**. Disponível em: <[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8848/162/saude-repassa-r\\$-85-milhoes-para-combate-a-dengue-em-pernambuco.html](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8848/162/saude-repassa-r$-85-milhoes-para-combate-a-dengue-em-pernambuco.html)> Acesso em: 29 jan. 2013

BRUM, M.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E. **Virologia Veterinária**, editora ufsm, Santa Maria, 2007, p. 61-75.

BUSTIN, S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, p. 169-193, 2000.

CHANG, G. Molecular biology of dengue virus. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, p. 175-197, 1997.

CLYDE, K.; KYLE, J.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v.80, p. 11418-11431, 2006.

COFFEY L. *et al.* Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes Infect**, France, v. 11, p. 143–156, 2009.

CORDEIRO, M. *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, p. 605-611, 2007a.

CORDEIRO, M. *et al.* Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, p. 1128-1134. 2007b.

CORDEIRO, M. **Evolução da dengue no estado de Pernambuco, 1987 – 2006: epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes**. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

DAFFIS, S. *et al.* Interferon Regulatory Factor IRF-7 Induces the Antiviral Alpha Interferon Response and Protects against Lethal West Nile Virus Infection, **Journal of Virology**, Baltimore, v. 82, p. 8465-8475, 2008.

DATTA, S. *et al.* Mechanism of HCV's resistance to IFN- $\alpha$  in cell culture involves expression of functional IFN- $\alpha$  receptor 1. **Virology journal**, London, v. 8, p. 1-18, 2011.

DEAUVIEAU, F. Innate immune responses in human dendritic cells upon infection by chimeric yellow-fever dengue vaccine serotypes 1-4, **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 76, p. 144-154, 2007.

DE SIMONE, T. *et al.* Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.98, p. 553-562, 2004.

DEEN, J. Editorial: the challenge of dengue vaccine development and introduction. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 9, p. 1-3, 2004.

DENGUE é 'maldição da urbanização', diz jornal suíço. **BBC Brasil**, Brasília, 2008. Disponível em: <[http://www.bbc.co.uk/portuguese/reporterbbc/story/2008/03/080328\\_denguepresstp.shtml](http://www.bbc.co.uk/portuguese/reporterbbc/story/2008/03/080328_denguepresstp.shtml)> Acesso em: 10 dez. 2010.

DEROECK, D.; DEEN, J.; CLEMENS, J. Policymakers' views on dengue fever/dengue haemorrhagic fever and the need for dengue vaccines in four southeast Asian countries. **Vaccine**, Guildford, v. 22, p. 121-129, 2003.

DERVEAUX, S.; VANDERSOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, San Diego, v. 50, p. 227 – 230, 2010.

DIAMOND, M. *et al.* Modulation of dengue virus infection in human cells by alpha, beta and gamma interferons, **Journal of Virology**, Baltimore, v. 74, p. 4956-4966, 2000.

ESPADA-MURAO, L.; MORITA, K. Dengue and Soluble Mediators of the Innate Immune System. **Tropical Medicine and Health**, Oxford, v. 39, p. 53-62, 2011.

FALGOUT, B.; MILLER, R.; LAI, C. Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 67, p. 2034-2042, 1993.

FIGUEIREDO, L. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 15-20, 1999a.

FINK, J. *et al.* Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 1, p. 86-93, 2007.

FLORES, E. Diagnóstico laboratorial das infecções víricas. In: \_\_\_\_\_. **Virologia Veterinária**, editora ufsm, Santa Maria, 2007, p. 297- 326.

FOY, E. *et al.* Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 2986-2991, 2005.

FRAGA, D.; MEULIA, T.; FENSTER, S. **Real-Time PCR: Current Protocols Essential Laboratory Techniques**. 3 ed., Baltimore: John Wiley & Sons, 2008.

FREDERICKSEN, B. *et al.* Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 82, p. 609-616, 2008.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). **Manual de dengue: Vigilância Epidemiológica e Atenção ao Doente**. Brasília-DF, 1996.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil 1980-1998. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, DF, 1999. Edição especial. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_epi\\_edicao\\_especial.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_epi_edicao_especial.pdf)> Acesso em: 15 dez. 2010.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Exposição Dengue**. Disponível em: <[http://www.invivo.fiocruz.br/dengue/virus\\_pt.htm](http://www.invivo.fiocruz.br/dengue/virus_pt.htm)>. Acesso em: 03 nov. 2010

GRANDVAUX, N. *et al.* The antiviral response: from viral invasion to evasion, **Current Opinion Infectious Disease**, London, v. 15, p. 259-267, 2002.

GUBLER, D. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: \_\_\_\_\_. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. 1 ed., Cambridge: CAB International, v. único, 1997, p 1- 22.

GUBLER D. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D.; MELTZER, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Advances in Virus Research**, New York, v. 53, p. 35-70, 1999.

GUIMARÃES, R. Princípios da imunopatogenia do dengue hemorrágico. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 62-70, 1999.

GUY, B. *et al.* Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 2, p. 51-64, 2001.

GUZMAN, M. Advances in the development of a vaccine against dengue. **Acta Científica Venezolana**, Caracas, v. 49, n. 1, p. 38-45, 1998.

GUZMAN, K. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, p. 33-42, 2002.

HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses, **Virology**, New York, v. 344, p. 119-130, 2005.

HALSTEAD, S. Pathogenesis of dengue challenges to molecular biology, **Science**, Washington, v. 239, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S.; MARCHETTE, N. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 69, p. 5-11, 2003.

HARRIS, E. *et al.* Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 63, n. 1-2, p. 5-11, 2000.

HENCHAL, E.; PUTNAK, J. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, p. 376-396, 1990.

HIBBERD, M. *et al.* A genomics approach to understanding host response. **Novartis Found Symposium**, Chichester, v. 277, p. 206 – 214, 2006.

HO, L. J. *et al.* Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell, **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, p. 8163-8172, 2005.

JANEWAY, C. *et al.* **Imunobiologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença**. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2006.

JONES, M. *et al.* Dengue Virus Inhibits Alpha Interferon Signaling by Reducing STAT2 Expression, **Journal of Virology**, Baltimore, v. 79, p. 5414-5420, 2005.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Antiviral signaling through recognition receptors. **The Journal biochemistry**, Tokyo, v. 141, n. 2, p. 137-145, 2007.

KHIN, M. *et al.* Infection, dissemination, transmission and biological attributes of dengue-2 PDK-53 candidate virus vaccine virus after oral infection in *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 51, p. 864-869, 1994.

KOYAMA, S. *et al.* Innate immune response to viral infection. **Cytokine**, San Diego, v. 43, n. 3, p.336-341, 2008.

KREUTZ, L. Resposta imunológica contra vírus. In: FLORES, E. **Virologia Veterinária**. editora ufsm, Santa Maria, 2007, p. 237-259.

KURANE, I. *et al.* High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, p. 222-229, 1993.

KYLE, J.; BEATTY, R.; HARRIS, E. Dengue virus infects macrophages and dendritic cell in a mouse model of infection, **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 195, p.1808-1817, 2007.

LAOPRASOPWATTANA, K. *et al.* Dengue virus (DV) enhancing antibody activity preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection, **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 192, p. 510-519, 2005.

LEI, H-Y. *et al.* Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. **Journal of Biomedical Science**, Dordrecht, v.8, p. 377-388, 2001.

LIN, R. *et al.* Blocking of the alpha interferon-induced Jak-Stat signaling pathway by Japanese encephalitis virus infection, **Journal of Virology**, Baltimore, v. 78, p. 9285-9294, 2004.

LINDENBACH, B.; RICE, C. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, New York, v. 59, p. 23-61, 2003.

LINDENBACH, B.; THIEL, H.; RICE, C. Flaviviridae: The Viruses and Theirs Replication. In: KNIPE, D.; HOWLEY, P. **Fields Virology**. 5 ed., Washington: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, v. 2, 2007, p. 250-255.

LIGON, B.L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: A review of the history, transmission, treatment, and prevention. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, New York, v.16, p. 60-65, 2004.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantification PCR and  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402 - 408, 2001.

LÓPEZ, C. *et al.* Type I interferon induction pathway, but not released interferon, participates in the maturation of dendritic cells induced by negative-strand RNA viruses, **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 187, p. 1126-1136, 2003.

MALAVIGE, G. *et al.* Dengue viral infections, **Postgraduate Medical Journal**, London, v. 80, p. 588-601, 2004.

MASHIMO, Y. *et al.* Critical Promoter Region for Statin-Induced Human Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Transcription in EA.hy926 Cell. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, Tokyo, v. 20. 2012.

MAZZON, M. *et al.* Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation, **Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 200, p. 1261-1270, 2009.

MCKENNA, K.; BEIGNON, A.; BHARDWAJ, N. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 1, p.17-27, 2005.

MEAGER, A. Biological assays for interferons. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 261, p. 21-36, 2002.

MOHAMMED, H. *et al.* Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. **Transfusion**, Arlington, v. 48, p.1345-1348, 2008.

MONATH, T.; HEINZ, F. Flaviviruses. In: FIELDS, B.; KINIPPE, P. **Fields Virology**. Lippincott-Raven Publisher, 3 ed., c. 31, 1996, p. 961-1034.

MORRISON, J.; AGUIRRE, S.; FERNANDEZ-SESMA, A., Innate Immunity Evasion by dengue virus. **Viruses**, Basel, v. 4, p. 397-413, 2012

MOURA, L. **Estudo de Polimorfismos Alélicos em Genes do Sistema Complemento (Fator D e Fator H) e sua Influência sobre o Desenvolvimento da Dengue Grave**. 2011. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) – Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife, 2011.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R.; ROSSMANN, M. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 13-22, 2005.

MUÑOZ-JORDÁN, J. *et al.* Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington v. 100, p. 14333–14338, 2003.

MURTHY, H. *et al.* Crystal structure of Dengue virus NS3 protease in complex with a Bowman-Birk inhibitor: implications for flaviviral polyprotein processing and drug design. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 301, p. 759-767, 2000.

NAVARRO – SANCHEZ, E.; DESPRÉS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate immune responses to dengue virus, **Archives of Medical Research**, New York, v. 36, p. 425-435, 2005.

NAKAGAWA, M.; SAKAMOTO, N.; ENOMOTO, N. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 313, p. 42-47, 2004.

NOBLE, C. *et al.*, Strategies for development of dengue virus inhibitors, **Antiviral Research**, Amsterdam, V. 85, p. 450-462, 2010.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue and Dengue haemorrhagic fever**. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Disease. Geneva, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue and severe dengue**. Geneva, 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acesso em: 10 dez 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and controlled**. Geneva, 2009.

- OSANAI, C. *et al.* Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 25, n.1, p.53-54, 1983.
- PALUCKA, A. Dengue virus and dendritic cell, **Nature Medicine**, New York, v.6, n. 7, p.748-749, 2000.
- PATEL, D. *et al.* High Throughput Screening for Small Molecule Enhancers of the Interferon Signaling Pathway to Drive Next-Generation Antiviral Drug Discovery. **PLoS ONE**, San Francisco, 5. Ed, v. 7, 2012.
- PAULMURUGAN, R. *et al.* *In Vitro* and *in Vivo* Molecular Imaging of Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Homo- and Heterodimerization: Exploration of New Modes of Receptor Regulation. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 25, p. 2029-2040, 2011.
- RAMOS, F. Hemoterapia e febre Dengue. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, São Paulo, v. 30, p. 61-69, 2008.
- RESTREPO, B. *et al.* Serum Levels of Cytokines in Two Ethnic Groups with Dengue Virus Infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 5, p.673-677, 2008.
- RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature, **Virology**, New York, v. 174, p. 479-493, 1990.
- RIGAU-PÉREZ, J. *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Lancet**, London v. 352, p. 971-977, 1998.
- RIGAU-PÉREZ, J. *et al.* The reappearance of dengue-3 and subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 67, p. 355-362, 2002.
- RODRIGUEZ-MADOZ, J. *et al.* Inhibition of the Type I Interferon Response in Human Dendritic Cells by Dengue Virus Infection Requires a Catalytically Active NS2B3 Complex. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 84, p. 9760-9774, 2010.
- ROEHIG, J. Immunochemistry of dengue viruses. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.) **Dengue and dengue hemorrhagic fever**, CAB International, 1997, p.199-214.
- ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 26, p. 337-343, 1977.
- ROTHMAN, A. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 113, p. 946-951, 2004.
- SAMUEL, C. Antiviral actions of interferons. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 4, p. 778-809, 2011.

SABIN, A. Research on Dengue during World War II. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.1, p.30-50, 1952.

SANOFI PASTEUR (França). **Sanofi Pasteur anuncia a publicação na *The Lancet* dos resultados do primeiro estudo de eficácia no mundo realizado com sua vacina candidata contra a dengue.** Comunicado de imprensa Sanofi Pateur. São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.sanofi.com.br/1/br/pt/download.jsp?file=C9682420-DD2B-4B0B-8490-5CCDA2EC6326.pdf>> Acesso em: 20 dez 2012.

SCHATZMAYR, H. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95 Suppl 1, p. 179-81, 2000.

SETH, R. B.; SUN, L.; CHEN, ZHIJIAN J. Antiviral innate immunity pathways, **Cell Research**, Beijing, v. 16, p. 141-147, 2006.

SIERRA, B.; KOURI, G.; GUZMÁN, M. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **Archives of Virology**, Wien, v. 152, p. 533-542, 2007.

SILVA, A. **Estudo de cinética de viremia do vírus dengue sorotipo 3 em formas clínicas da dengue com diferentes níveis de gravidade.** 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

SILVA, M. **Estudo do nível de expressão dos genes que codificam os interferons alfa, beta e gama em pacientes com diferentes formas clínicas da dengue.** 2010. Monografia (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva, **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 83, p. 22-35, 2007.

SHINGAI, M. *et al.* Differential Type I IFN-Inducing Abilities of Wild-Type versus Vaccine Strains of Measles Virus. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 179, p. 6123-6133, 2007.

SMILOVIĆ, V. *et al.* A novel reporter gene assay for interferons based on CHO-K1 cells, **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam. v. 333, p. 192-196, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. **Dengue tipo 4: dois casos foram notificados em Pernambuco.** Disponível em: <[http://www.sbinfecto.org.br/publicoleigo/default.asp?site\\_Acao=mostraPagina&paginaId=14&mNoti\\_Acao=mostraNoticia&noticiaId=25682](http://www.sbinfecto.org.br/publicoleigo/default.asp?site_Acao=mostraPagina&paginaId=14&mNoti_Acao=mostraNoticia&noticiaId=25682)>. Acesso em: 09 maio 2011.

SOUZA, J. **Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção.** 1.ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2007.

SWAMINATHANAND, S.; KHANNA, N. Viral Vaccines for Dengue: The Present and the Future. **Dengue Bulletin**, New Delhi, v. 27, p. 181-191, 2003.

TAUIL, P. Urbanização e ecologia do dengue. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 99-102, 2001.

TAUIL, P. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 867-871, 2002.

THERMO SCIENTIFIC, **ELISA technical guide and protocols**. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/files/TR0065-ELISA-guide.pdf>> Acesso em: 5 abr 2011

TEIXEIRA, M.; BARRETO, M.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v. 8, p. 5-33. 1999.

TEO, K.; WRIGHT, P. Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 337-341, 1997.

TSAI, Y. *et al.* Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication *in vitro*. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 604–615, 2009.

UBOL, S. *et al.* Differences in Global Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells Indicate a Significant Role of the Innate Responses in Progression of Dengue Fever but Not Dengue Hemorrhagic Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 197, p. 1459–1467, 2008.

UMAREDDY, I. *et al.* Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines, **Journal of General Virology**, London, v. 89, p. 3052-3062, 2008.

WANG, W. *et al.* Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 43, n.8, p. 1023-30, 2006.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by realtime PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, New York, v. 27, p. 254-298, 2006.

WU, S. *et al.* Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection, **Nature medicine**, New York, v. 6, p. 816-820, 2000.

YAMADA, K. I. *et al.* Virus Isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 24, p. 907-912, 2002.

YU, I-MEI. *et al.* Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. **Science**, Washington, v. 319, p. 1834-1837, 2008.

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Comitê de Ética  
em Pesquisa

**Título do Projeto:** Influência da expressão de genes humanos envolvidos na resposta imune inata no desenvolvimento da Febre Hemorrágica da Dengue: validação de marcadores moleculares preditivos para a forma severa da doença e alvos moleculares para intervenção.

**Pesquisador responsável:** Marli Tenório Cordeiro

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 20/07/2009

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 32/09

**Registro no CAAE:** 0030.0.095.000-09

### PARECER Nº 44/2009

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 25 de setembro de 2012. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 25 de setembro de 2009.

*Grizelle Campesano Jansen*  
 Grizelle Campesano Jansen  
 Farmacêutica  
 Coordenadora  
 Mat. 61496 0463376  
 CPqAM / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;

• Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 25/09/2010.

Campus da UFPE - Av. Moraes Regis  
 CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639  
 Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639  
 Recife - PE - Brasil

