



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

DANIEL GUERREIRO DINIZ

INFLUÊNCIAS DA IDADE E DO AMBIENTE SOBRE O CURSO TEMPORAL DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE ACENTUADA POR ANTICORPO
HETERÓLOGO EM MODELO MURINO: ENSAIOS COMPORTAMENTAIS E
HISTOPATOLÓGICOS

Belém - Pará

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

DANIEL GUERREIRO DINIZ

INFLUÊNCIAS DA IDADE E DO AMBIENTE SOBRE O CURSO TEMPORAL DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE ACENTUADA POR ANTICORPO
HETERÓLOGO EM MODELO MURINO: ENSAIOS COMPORTAMENTAIS E
HISTOPATOLÓGICOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, como requisito para obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Belém - Pará

2014

Biblioteca Central da UFPA, Belém, Pará, Brasil.

Guerreiro Diniz, Daniel.

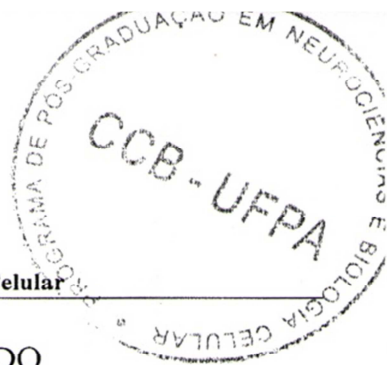
Influências da idade e do ambiente sobre o curso temporal da infecção pelo vírus da Dengue acentuada por anticorpo heterólogo em modelo murino: ensaios comportamentais e histopatológicos: Daniel Guerreiro Diniz, 2014, total de folhas 72.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2014.

1. Dengue acentuada por anticorpo heterólogo. 2. Ambiente. 3. Envelhecimento. 4. Linfócitos. 5. Modelo murino imunocompetente para Dengue. I. Universidade Federal do Pará. Instituto de ciências biológicas II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular



ATA DE DEFESA DE TESE PARA O DOUTORADO

Programa: Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

Área de concentração: Neurociências

Candidato: DANIEL GUERREIRO DINIZ

Tema: "INFLUÊNCIAS DA IDADE E DO AMBIENTE SOBRE O CURSO TEMPORAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE ACENTUADA POR ANTICORPO HETERÓLOGO EM MODELO MURINO: ENSAIOS COMPORTAMENTAIS E HISTOPATOLÓGICOS"

Data: 03 de janeiro de 2014, às 8h

Local: Auditório da Anatomia Patológica do Hospital Universitário João de Barros Barreto

Após o candidato apresentar os resultados do seu estudo e responder às perguntas dos examinadores, a comissão examinadora reuniu-se e resolveu pela sua:

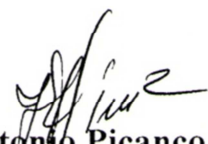
☒ APROVAÇÃO

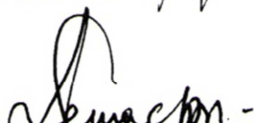
☐ REPROVAÇÃO

Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Banca Examinadora deu por encerrado os trabalhos e esta ata foi assinada por todos os membros da comissão examinadora.


Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz - UFPA
(Orientador, sem direito a voto)


Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos – IEC


Prof. Dr. José Antonio Picanço Diniz Jr. – IEC


Prof. Dra. Samia Demachki - UFPA

AGRADECIMENTOS

A minha família (Ana Clotildes Guerreiro Diniz, Cristovam Wanderley Picanço Diniz, Cristovam Guerreiro Diniz e Cesar Guerreiro Diniz) pela ajuda e confiança depositada.

Ao meu orientador e pai Cristovam Wanderley Picanço Diniz.

A Izabela Negrão Frota de Almeida pelo carinho, atenção e ajuda.

A todos do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção que contribuíram de forma decisiva nessa caminhada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelos quatro anos de bolsa.

A todos que me ajudaram de forma direta e indireta na preparação deste manuscrito.

A todos os órgãos envolvidos no financiamento do projeto: CNPq (300460/2005-8, 301955/2007-7, 471444/2006-5, 454737/2010-6), INCT-FHV/CNPq/CAPES/FAPESPA (573739/2008-0), FINEP/FADESP (01.04.0043.00), PROPESP-UFPA-FADESP.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”.

(Albert Einstein, 1879 - 1955)

RESUMO

Por conta de que o ambiente enriquecido (AE) aumenta a atividade de células T e contribuí para imunopatogênese durante as infecções heterólogas do vírus da dengue (VDEN), nós hipotetizamos que animais que crescem em AE em comparação com animais que crescem em ambiente padrão (AP), ao serem infectados pelo vírus da dengue, desenvolveriam formas mais graves da doença. Além disso, como os animais velhos apresentam menor declínio funcional em células T de imunidade adaptativa, testamos a hipótese de que camundongos AE velhos ao serem infectados pelo vírus da dengue apresentariam maior taxa de mortalidade do que animais AP pareados por idade, e isso estaria associado à maior hiperplasia dos linfócitos T. Para testar essas hipóteses implantamos regime de inoculações múltiplas em animais adultos de 9 e 18 meses de idade. Dois regimes de inoculação foram testados: inoculações múltiplas de homogeneizado cerebral infectado por um único sorotipo (IUS) ou inoculações alternadas daquele homogeneizado e de anticorpo heterólogo (ICAH). Em ambos os casos foram feitas inoculações múltiplas intraperitoneais encontrando-se diferenças significativas no curso temporal da doença nos animais submetidos a um ou outro regime de inoculação. Comparado ao grupo ICAH para o qual detectou-se diferenças significativas entre os grupos AE e AP (Kaplan-Meyer log-rank test, $p = 0,0025$), não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos experimentais AP e AE submetidos ao regime IUS (Kaplan-Meyer log-rank test, $p = 0,089$). As curvas de sobrevivência dos grupos AE e AP sob o regime ICAH foram estendidas após a injeção de glicocorticoides reduzindo-se os sintomas e o número de mortes e esse efeito foi maior no grupo AE do que no AP (Kaplan-Meyer log-rank test, $p = 0,0162$). No regime ICAH, o grupo AE mostrou sinais clínicos mais intensos do que o AP e isso incluiu dispneia, tremor, postura encurvada, imobilidade, paralisia pré-terminal, choque e eventual morte. Comparado ao grupo AP, o grupo AE independentemente da idade apresentou maior mortalidade e sinais clínicos mais intensos. Esses sinais clínicos mais intensos nos animais do ambiente enriquecido submetidos ao regime ICAH foram associados à maior hiperplasia de linfócitos T no baço e maior infiltração dessas células no fígado, pulmões e rins. Embora a hiperplasia linfocítica e a infiltração tenham se mostrado mais intensas nos animais velhos do que nos jovens, a imunomarcagem para os antígenos virais nos mesmos órgãos foi maior nos jovens

do que nos velhos. A presença do vírus nos diferentes órgãos alvo foi confirmada por PCR em tempo real. Tomados em conjunto os resultados sugerem que o ambiente enriquecido exacerba a resposta inflamatória subsequente à infecção por dengue acentuada por anticorpo heterólogo, e isso está associado à sintomas clínicos mais intensos, maior taxa de mortalidade e ao aumento da expansão de células T. Os ensaios comportamentais e histopatológicos do presente trabalho permitiram testar e validar novo modelo murino imunocompetente para estudos em dengue permitindo testar numerosas hipóteses oriundas de estudos epidemiológicos e in vitro.

Palavras-chave: Dengue acentuada por anticorpo heterólogo, ambiente, envelhecimento, linfócitos T, modelo murino imunocompetente para dengue

ABSTRACT

Because the enriched environment (EE) increases the activity of T cells, contribute to the immunopathogenesis of dengue virus infections (VDEN) we hypothesized that animals maintained in an enriched environment (AE) compared with animals from impoverished environment of standard laboratory cages (IE), would develop more severe forms of the disease. Because older animals have less functional decline in adaptive immunity T cells, we tested the hypothesis that AE old mice would show higher number of deaths and more intense clinical signs than age-matched IE animals, and this would be associated with greater expansion of T lymphocytes. To test these hypotheses we established scheme of multiple inoculations in adult animals of 9 and 18 months of age. Two regimens of inoculation were tested: multiple injections of single serotype (VDEN3 genotype III) infected brain homogenate (SS) or alternatively multiple injections with that infected brain homogenate followed 24h later by inoculation of heterologous antibody (SSHA). In both cases multiple i.p. inoculations were done. It was found significant differences in the temporal progression of the disease in the animals submitted to one or another scheme of inoculation: SSHA group (Kaplan -Meier log-rank test, $p = 0.0025$); IUS (Kaplan -Meier log-rank test, $p = 0.089$). The survival curves of AE and AP under SSHA regime were extended after a single injection of glucocorticoids, reducing the symptoms and the number of deaths, and these effects were greater in the EE group than in the IE (Kaplan-Meier log-rank test, $p = 0.0162$). In SSHA scheme, EE group showed clinical signs more intense than the AP and those included dyspnea, tremor, hunched posture, immobility, pre-terminal paralysis, shock and eventual death. Compared to the IE group, the AE group regardless of age showed higher mortality and more severe clinical signs. These more severe clinical signs in EE animals under SSHA regime were associated with increased hyperplasia of T lymphocytes in the spleen and increased infiltration of these cells in the liver, lungs and kidneys. Although lymphocytic hyperplasia and infiltration have been more intense in older than in younger animals, immunostaining for viral antigens in target organs was higher in young than in the aged mice. The presence of the virus in various infected organs were confirmed by real time PCR. Taken together the results suggest that the enriched environment life style exacerbates the subsequent inflammatory response

to infection, and that is associated with more severe clinical symptoms, higher mortality and increased T cell expansion. Behavioral and histopathological data validate a new immunocompetent murine model for studies on dengue disease allowing in vivo tests of a number of hypothesis raised by epidemiological and in vitro studies.

Keywords: Antibody enhanced dengue disease, environment, aging, T lymphocytes, immunocompetent murine model for dengue disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vetores da dengue.....	02
Figura 2. Distribuição, risco e carga de dengue global.....	03
Figura 3. Resposta do hospedeiro.....	07
Figura 4. Alojamento dos camundongos.....	22
Figura 5. Atividade de remoção de ração (burrowing).....	23
Figura 6. Aparato do campo aberto (open field).....	24
Figura 7. Aparato da caixa claro/escuro.....	25
Figura 8. Linha do tempo experimental 01.....	28
Figura 9. Fotomicrografias de pulmão e fígado.....	31
Figura 10. Linha do tempo experimental 02.....	32
Figura 11. Gráficos do comportamento doentio.....	35
Figura 12. Curvas de sobrevivência.....	37
Figura 13. Curvas de sobrevivência.....	39
Figura 14. Imunomarcagem para glicoproteína do VDENV (fígado e pulmão)...	42
Figura 15. Imunomarcagem para glicoproteína do VDENV (baço e rim).....	43
Figura 16. Fotomicrografias de hematoxilina-eosina (fígado e pulmão).....	45
Figura 17. Fotomicrografias de hematoxilina-eosina (baço e rim).....	46
Figura 18. Fotomicrografias de linfócitos T.....	48
Figura 19. Frequência de células T de memória, suscetibilidade e taxa de hospitalização.....	53
Figura 20. Repertório de células T CD4 positivas em função da idade.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AE - Ambiente enriquecido;	LPS - Lipopolissacarídeo;
AP - Ambiente empobrecido;	MIF - Fator de inibição de migração de macrófagos
CCL - quimiocina ligante	NF - κ B - Fator nuclear κ B
CO - Controle;	NF κ -B - Fator nuclear κ B
CV - Carga viral;	NK - Células exterminadoras naturais
CXCL - subfamília de quimiocinas	PBS - Tampão fosfato salina;
CXCR - Receptor de quimiocinas	PVC - Poli cloreto de vinila;
DHF - Dengue hemorrágica	RNA - Ácido ribonucleico;
DPI - Dias pós-inoculação;	SCD - Síndrome de choque da Dengue;
Fc γ R - Receptor gama Fc	SNC - Sistema nervos central;
FH - Febre hemorrágica;	SPI - Semanas pós-inoculação;
i.p - Intraperitoneal;	Tfh - Linfócito auxiliar T folicular
ICAH - Inoculações cruzadas com anticorpos heterólogos;	TNF- α - Fator de necrose tumoral;
IFN- α - Interferon alfa	T $\gamma\delta$ - Linfócito T gama delta
IFN- γ - Interferon gamma;	VDEN - Vírus da Dengue;
IgG - Imunoglobulina G	VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
IL- Interleucina	
IL-1 β - Interleucina 1 beta	
IUS - Inoculação de um único sorotipo;	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Dengue, uma doença tropical negligenciada.....	01
1.2. Patogênese das formas severas da dengue: uma história inacabada.....	03
1.3. Resposta imune à infecções virais durante o envelhecimento.....	10
1.4. Exercício físico, ambiente enriquecido, envelhecimento e resposta Imune.....	13
1.5. Modelos murinos de dengue.....	15
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Geral.....	20
2.2. Específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Grupos experimentais e inoculações.....	21
3.2. Homogeneizados cerebrais infectados.....	22
3.3. Atividade de remoção de ração (burrowing).....	23
3.4. Atividade locomotora exploratória em campo aberto (open field).....	24
3.5. Caixa claro/escuro (CCE).....	25
3.6. Histologia e imuno-histoquímica.....	26
3.7. Imuno-histoquímica para linfócitos T e B.....	26
3.8. Imunomarcagem para micróglias.....	27
3.9. Extração de RNA.....	27
4. Grupos experimentais e comitê de ética.....	29
4.1. Alojamento e sequência experimental.....	29
4.2. Imunofluorescência.....	30
5. RESULTADOS.....	34
5.1. Infecções múltiplas com um único sorotipo em comparação com infecções acentuadas por anticorpo heterólogo: a escolha do modelo.....	34
5.2. Ensaio comportamental.....	34
5.3. Sinais clínicos e sobrevivência.....	36

5.5. A influência da idade e do ambiente sobre o curso temporal da infecção por dengue acentuada por anticorpo heterólogo.....	38
5.6. Sinais clínicos e sobrevivência.....	38
5.7. Atividade de burrowing.....	40
5.8. Alterações histopatológicas.....	41
6. DISCUSSÃO	50
6.1. Regime de infecção, sinais de doença e resposta inflamatória exacerbada.....	50
6.2. Ambiente enriquecido, envelhecimento e dengue.....	53
6.3. Modelos experimentais murinos imunocompetentes em dengue.....	55
6.4. Considerações finais e perspectivas.....	57
7. CONCLUSÕES	59
8. REFERÊNCIAS	60
Anexo 1. Environmental influences on antibody-enhanced dengue disease outcomes.....	77
Anexo 2. Aging and environmental enrichment exacerbate inflammatory response on antibody-enhanced dengue disease.....	86
Anexo 3. Comitê de ética.....	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue, uma doença tropical negligenciada.

Crescem em importância nas agendas dos governos em escala planetária, os problemas gerados por doenças infecciosas, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. De fato as doenças infecciosas são o motivo da segunda causa de morte mais frequente no tempo presente e a evolução contínua de doenças emergentes e reemergentes em países do terceiro mundo deverá elevar ainda mais o impacto global das doenças infecciosas neste século (Fauci, 2001; Morens, Folkers e Fauci, 2004; Morens e Fauci, 2013). Um exemplo ilustrativo das doenças reemergentes na agenda dos governantes é o caso da dengue no Brasil, que assume proporções epidêmicas, em particular, a partir da introdução do vírus da dengue (VDEN) sorotipo 3 (VDEN-3) (Nogueira, De Araujo e Schatzmayr, 2007; De Araújo *et al.*, 2012).

O VDEN é membro de um grande grupo de espécies virais RNA-positivas da família Flaviviridae, compreendendo quatro grupos antigênicos (sorotipos) e cerca de três a cinco grupos genéticos (genótipos) dentro de cada sorotipo (Rico-Hesse, 2010). Os sorotipos 2 e 3 são os mais frequentemente associados com as alterações do sistema nervoso central (SNC), contribuindo com cerca de 4 a 5% do total dos casos de infecção por dengue (Puccioni-Sohler *et al.*, 2009). O VDEN é do tipo não citopático contra o qual a resposta imunológica celular é essencial para sua eliminação (Gagnon *et al.*, 1996; St John *et al.*, 2011).

A dengue é uma arbovirose de alta prevalência nos países tropicais onde o mosquito vetor *Aedes aegypti* (proveniente da África e mais comum nas regiões tropicais e subtropicais) e *Aedes albopictus* (mais comum no continente asiático), está presente (Figura 1). A doença humana associada à infecção viral em sua forma branda (não hemorrágica) está associada a mais de 100 milhões de casos por ano que se somam a outros 250.000 a 500.000 da forma hemorrágica, concentrados sobretudo nas regiões tropicais do planeta onde vivem sob risco mais de 3.6 bilhões de pessoas (Guzman *et al.*, 2010; Wilder-Smith *et al.*, 2012; Bhatt *et al.*, 2013; St John, Abraham e Gubler, 2013). No

Continente Americano em particular, o VDEN tem gerado hiperendemias que parecem associadas ao fato de que múltiplos sorotipos circulam de forma simultânea (Laughlin *et al.*, 2012). A dengue é agora considerada uma doença tropical negligenciada e isso está refletido no fato de que apesar de ter se passado mais de um século de estudos sistemáticos muito dos aspectos da patogênese da doença permanecem sem solução com consequências econômicas e humanas dramáticas (Guabiraba e Ryffel, 2013; St John, Abraham e Gubler, 2013).

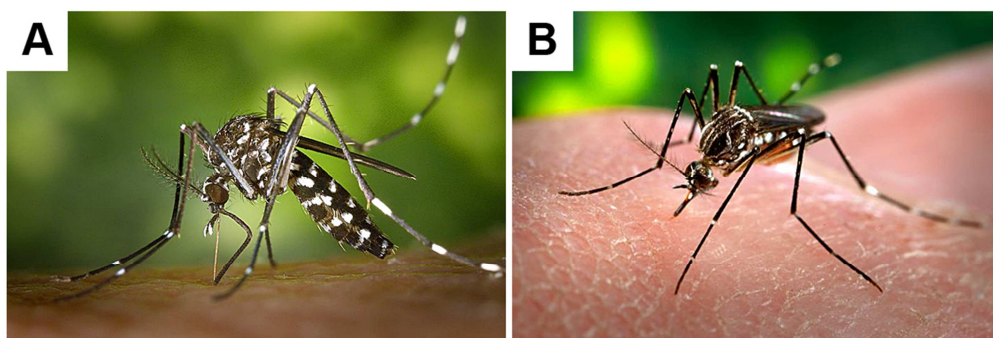


Figura 1. (A) *Aedes albopictus* (Culicidae), mosquito tigre asiático, transmissor da dengue, fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:CDC-Gathany-Aedes-albopictus-1.jpg>; (B) *Aedes aegypti* (Culicidae), mosquito-da-dengue, um exemplar adulto, mas comum nas regiões tropicais e subtropicais, fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Aedes_aegypti_CDC-Gathany.jpg

A ocorrência da doença e a probabilidade da dengue se transformar em pandemia tem aumentado anualmente (Bhatt *et al.*, 2013; Murray, Quam e Wilder-Smith, 2013). Além disso, a disseminação do vírus e o aumento do número de infecções em proporções epidêmicas, com 4 sorotipos amplamente distribuída, tem sido acompanhado do aumento do número de casos graves e fatais (Ranjit e Kissoon, 2011). Como se pode ver na Figura 2, as regiões tropical e subtropical são de longe as que apresentam o maior número de infecções anuais e para as quais a infecção já é ubíqua com pequenas variações espaciais no que concerne ao risco, que parece crescer com a precipitação pluviométrica, aumento sazonal da temperatura e grau de urbanização (Bhatt *et al.*, 2013). Baseado nas evidências consensuais (Figura 2a) estimou-se ocorrência de cerca de 96 milhões de casos por ano nas regiões tropicais (incluindo-se infecções aparentes e subclínicas) com maior risco estimado para as Américas e a Ásia (figura 2b). Esses números foram obtidos a partir de meta-análise baseada em 2838 artigos publicados e foram estimados a partir de técnicas cartográficas, relações prováveis entre número

de notificações e percentual relativo de casos subclínicos assim como em estudos regionais de demografia de 2010. Empregando estatística multivariada estabeleceu-se um modelo confiável que define a probabilidade de ocorrência da infecção por dengue (sintomática e subclínica) melhorando a acuidade das medidas prévias de risco relativo, estimado pela Organização Mundial de Saúde (Bhatt *et al.*, 2013).

1.2. Patogênese das formas severas da dengue: uma história inacabada.

Todos os sorotipos do VDEN causam as mesmas manifestações clínicas com padrões similares de disseminação sistêmica e com tropismo celular principalmente voltado para monócitos, macrófagos e células dendríticas (Rothman, 2011).

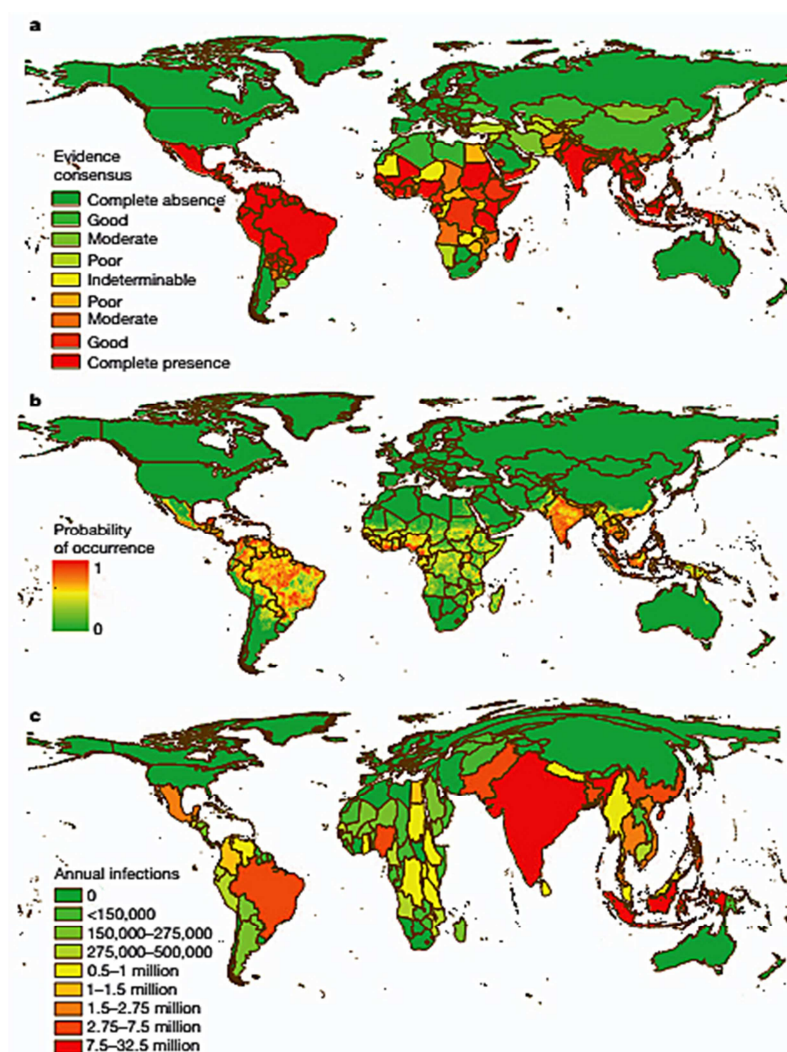


Figura 2. Evidência consensual, probabilidade de ocorrência e infecções anuais por DENGUE. Fonte: (Bhatt *et al.*, 2013)

Em condições habituais após a infecção primária de um hospedeiro humano suscetível, adulto ou adolescente, estabelece-se um episódio febril autolimitado, acompanhado por uma combinação de sintomas não específicos que incluem cefaléia, dor retro-orbital, mialgia e muito raramente manifestações hemorrágicas (Green e Rothman, 2006). Entretanto alguns pacientes, mais frequentemente idosos e recém-nascidos, desenvolvem a forma mais severa da doença: a dengue hemorrágica (DHF) cujo evento mais importante é o extravasamento de plasma e a hemoconcentração com redução do volume intravascular e insuficiência circulatória (Green e Rothman, 2006). Pacientes que desenvolvem hipotensão menor do que 20mm de Hg, ou mostram sinais de choque, com ou sem hemorragia são classificados como portadores da forma severa intitulada de choque sindrômico da dengue (SCD).

Linfócitos T, monócitos, macrófagos, hepatócitos e células endoteliais contribuem de forma significativa para o aumento da expressão de citocinas e quimiocinas incluindo IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL-8, CXCL-10, CXCL-11, MIF e VEGF no plasma de pacientes, constituindo a tempestade de citocinas associada às formas graves da doença (Green e Rothman, 2006; Costa *et al.*, 2013).

Aproximadamente 90% dos casos de DHF/SCD estão associados com uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo e os restantes 10% estão associados com infecções primárias. Esses números não podem ser usados, entretanto para minimizar o fato de que infecção primária por VDEN também pode causar doença severa e um bom exemplo disso foi o que se encontrou na epidemia por VDEN3 no Rio de Janeiro em 2002 onde 54% dos casos letais decorreram de infecções primárias (Nogueira *et al.*, 2005). Entretanto, pesquisas recentes demonstram que após uma infecção primária por um dos quatro sorotipos do VDEN, a imunidade adquirida pode agravar a doença e aumentar o risco relativo de desenvolvimento de dengue severa, após uma infecção secundária com outro sorotipo de VDEN; para maiores detalhes dos mecanismos imunológicos subjacentes ver (Costa *et al.*, 2013). Está fora do escopo do presente trabalho rever exaustivamente esses mecanismos, mas é útil descrevê-lo em linhas gerais, com ênfase na resposta linfocítica de particular interesse para os ensaios experimentais realizados.

As células da linhagem fagocítica mononuclear (monócitos, macrófagos e células dendríticas) representam o alvo primário para o vírus da dengue mas um conjunto de outras células também tem sido implicadas em estudos in vitro e isso inclui, hepatócitos, linfócitos B e T, células endoteliais, neurônios, e células musculares (Clyde, Kyle e Harris, 2006).

As células B e T desempenham papel fundamental na organização e regulação da resposta imune adaptativa a patógenos diversos, inclusive aos vírus. Essas células tem sua distribuição em clones e possuem receptores para antígenos altamente polimórficos o que lhes permite reconhecer classes de antígenos associados a variados grupos de patógenos. Após o reconhecimento antigênico essas células sofrem amplificação clonal e progressivamente adquirem funções efetoras que incluem a produção de fatores solúveis que ajudam outras células do sistema imune em sua função de eliminar células infectadas de forma precisa. Um pool de células T reativas a antígenos passa então a um estado quiescente mantendo por longo período a memória do antígeno encontrado (St John, Abraham e Gubler, 2013).

As células T uma vez no timo, sofrem um processo de seleção rigorosa sobrevivendo aquelas mais adequadas à tarefa de distinguir antígenos infecciosos estranhos ao organismo, daqueles não infecciosos e que pertencem ao próprio organismo (Fabbri, Smart e Pardi, 2003). Uma importante consequência da produção de células T defeituosas é um aumento da incidência de infecções virais (Fabbri, Smart e Pardi, 2003; Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011). Os linfócitos B após sua estimulação antigênica proliferam e se diferenciam em células de memória e plasmócitos que retêm a capacidade de produzir e secretar vastas quantidades de anticorpos (imunoglobulinas - Ig) específicos para o antígeno que iniciou a resposta. A ligação da imunoglobulina com seu antígeno específico forma o complexo antígeno-anticorpo que circula nos fluidos corporais. Esses complexos antígeno-anticorpo se ligam a receptores de imunoglobulinas (receptores Fc) específicos na superfície celular de monócitos e macrófagos (Chen, Maguire e Marks, 1996).

De forma breve, no contexto da infecção secundária por sorotipo

heterólogo, linfócitos B gerados para combater a infecção primária, respondem rapidamente, produzindo títulos altos de anticorpos que potenciam a infecção em curso, em vez de neutralizar o vírus. Essa resposta imune inadequada deu origem ao conceito de infecção por dengue acentuada por anticorpo heterólogo (Halstead, 2003); ver (Guabiraba e Ryffel, 2013) para revisão. Esses anticorpos não neutralizantes são capazes de reconhecer os epítomos dos antígenos virais e acentuar a infectividade do vírus através da formação de complexos vírus/anticorpo que são internalizados pelas células alvo. As células alvo (monócitos e macrófagos) expressam receptores para a porção Fc dos anticorpos (neste caso FcγR) que se liga a IgG. Assim os complexos vírus/anticorpo não neutralizados são capturados e internalizados. Esse processo de internalização de complexos vírus anticorpo em macrófagos e monócitos é cerca de 3 a 10% mais eficiente do que a infecção usual através do receptor viral toll-like, abundantemente expresso nessas células (Zarembek e Godowski, 2002). De forma intrigante, quando a internalização se dá através de complexos vírus anticorpo, alteram-se os mecanismos intracelulares de proteção antiviral e o que era para ser um mecanismo de defesa, passa a suprimir a produção de interferon tipo 1 (IFN1), facilitando a replicação intracelular do VDEN (Modhiran, Kalayanarooj e Ubol, 2010). Isso é particularmente verdadeiro nos pacientes com as formas graves da doença (Nielsen, 2009; Ubol e Halstead, 2010; Boonnak *et al.*, 2011; Rothman, 2011).

Os mecanismos fisiopatológicos das formas severas de dengue estão sendo investigadas em detalhe e desse esforço de vários grupos de pesquisa tem se tornado aparente a desregulação e o desequilíbrio da resposta imune celular como elemento principal (Navarro-Sánchez, Desprès e Cedillo-Barrón, 2005; Clyde, Kyle e Harris, 2006; Green e Rothman, 2006).

O vírus inoculado pela picada do mosquito vetor pode encontrar várias células do sistema imune na camada subcutânea incluindo as células dendríticas residentes, macrófagos, células de Langerhans e mastócitos (Wu *et al.*, 2000; Marovich *et al.*, 2001; St John *et al.*, 2011).

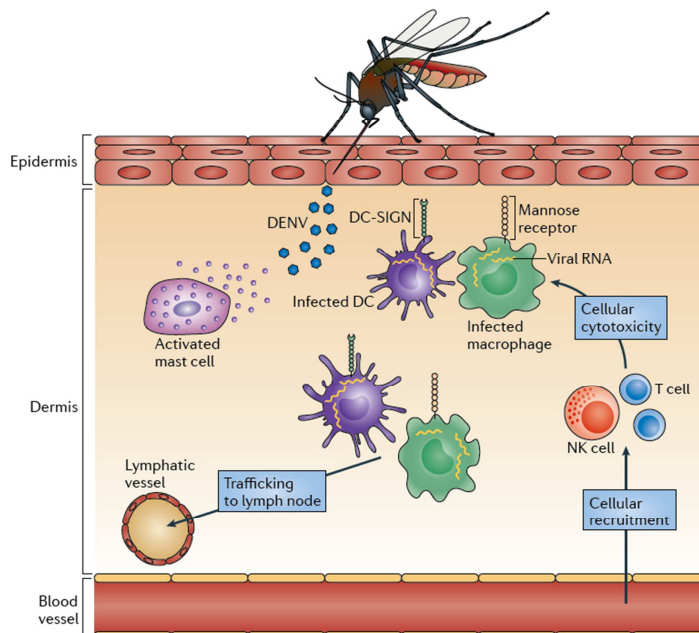


Figura 3. Resposta do hospedeiro infectado através da picada do vetor. A maioria das infecções pelo VDEN ocorrem após a inoculação do patógeno na camada subcutânea. As partículas virais então podem infectar células em torno (principalmente células dendríticas ou monócitos) e ativar mastócitos residentes. Uma resposta inflamatória local ao vírus prontamente recruta leucócitos dos vasos sanguíneos incluindo célula NK (natural killer) e células T com o intuito de prover a eliminação do vírus junto com as células infectadas no sítio da inoculação. Em seguida o vírus é transportado para um linfonodo através dos vasos linfáticos para então estabelecer uma infecção sistêmica. Essa resposta inflamatória local ocorre muitos dias antes dos sinais de infecção severa aparecerem. Figura extraída de (St John, Abraham e Gubler, 2013).

A infecção de células dendríticas e macrófagos (Figura 3) se dá através de receptores para o VDEN existente em ambas as células (Tassaneetrithep *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2008). No macaco e no camundongo antígenos virais foram localizados em células cuja morfologia eram consistentes com os fagócitos mononucleares (Marchette *et al.*, 1973). No sítio da inoculação na fase inicial da infecção em humanos, as células do sistema imune, alvos da infecção primária, promovem igualmente *clearance* viral independente de anticorpos, de maneira similar ao que ocorre nas infecções pelo vírus West Nile onde células T $\gamma\delta$ desempenham papel essencial no *clearance* viral na pele (St John, Abraham e Gubler, 2013).

No camundongo as células NK e as células T NK (cujo recrutamento é feito por mastócitos residentes) são as responsáveis pelo *clearance* viral na pele e em linfonodos regionais (St John *et al.*, 2011). Os mastócitos apesar de não serem infectados pelo vírus detectam a presença e respondem ao vírus diretamente sem a participação de anticorpos, com a liberação de citocinas pró-inflamatórias (St John *et al.*, 2011). As células infectadas pelo vírus, iniciam por sua vez respostas pró-inflamatórias à replicação viral que é iniciada pelo

reconhecimento intracelular do patógeno envolvendo o receptor 3 Toll-like (Tsai *et al.*, 2009) e outros sensores citosólicos que uma vez ativados levam a vias de sinalização que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IFN I, IFN γ e IL-6) (Loo *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2009). Após à disseminação a partir da pele o VDENV é encontrado primeiro em linfonodos regionais e depois em linfonodos mais remotos e isso resulta em viremia (Marchette *et al.*, 1973) que pode ser detectada 24 a 48h antes do aparecimento dos sintomas clínicos. A partir desse momento mudanças substantivas são visíveis no padrão celular do sistema hematopoiético incluindo leucopenia, neutropenia, trombocitopenia e ocasionalmente eosinofilia (Halstead, 1989).

Macrófagos ativados que produzem IFN γ desempenham papel importante no clearance viral através da produção de óxido nítrico que inibe, pelo menos *in vitro*, a replicação do vírus. À medida que a viremia declina estabelece-se o aumento de permeabilidade do endotélio vascular cujo mecanismo tem sido atribuído aos níveis plasmáticos elevados das citocinas pró-inflamatórias (Hober *et al.*, 1993; Rothman, 2011). Nas formas graves da doença, entretanto o dano das células endoteliais associadas ao extravasamento de plasma, é dependente da produção exagerada de óxido nítrico (Lin *et al.*, 2004) e isso é ilustrativo de que a doença produzida pela dengue resulta da resposta imune em si mesma (Clyde, Kyle e Harris, 2006). Assim uma sequência de eventos que começa com uma infecção localizada na pele com a ativação do sistema imune inato, progride para uma infecção sistêmica caracterizada por replicação viral em órgãos alvo com altos títulos virais circulantes. As alterações patológicas mais severas, entretanto ocorrem quando os títulos virais circulantes decrescem e a febre declina (Halstead, 2007).

A infecção primária por dengue resulta em imunidade de longo prazo ao sorotipo infectante e em potencial, em imunidade parcial à infecções subsequentes com outros sorotipos. Não há documentação de reinfecções com o mesmo sorotipo produzindo sintomas e talvez isso seja decorrente da pré-existência de anticorpos neutralizantes fabricados durante a infecção primária. Entretanto a infecção secundária com um anticorpo heterólogo pode causar um amplo espectro de sintomas variando desde uma infecção subclínica até as formas severas de dengue hemorrágica (Guzman, Alvarez e Halstead, 2013).

Nas formas graves essa sequência de eventos que começa com a infecção de células dendríticas dispara uma cascata de fenômenos que convergem para a ativação imune aberrante de células T CD4⁺ e CD8⁺ com inversão da razão CD4/CD8 (Liu *et al.*, 2002). De forma coerente observou-se que linfócitos T CD8⁺ com reatividade cruzada aos sorotipos de VDENV, quando estimulados com peptídeos homólogos e heterólogos exibem diferentes receptores de sinalização (Friberg, Bashyam, *et al.*, 2011; Friberg, Burns, *et al.*, 2011). Associado a isso há uma redução do potencial citolítico e citotóxico dos linfócitos T sem prejuízo da produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e INF- γ (Mongkolsapaya *et al.*, 2003) que diante de uma infecção secundária tem sua magnitude expandida, caracterizando-se o que se tem chamado de a tempestade de citocinas (Pang, Cardosa e Guzman, 2007).

Esse nível elevado de citocinas pró-inflamatórias circulantes leva a modificação da permeabilidade do endotélio capilar com extravasamento de plasma, com ou sem hemorragia, instalando-se o choque vascular (Green e Rothman, 2006). Observa-se ainda contagem de plaquetas diminuída ($<100.000/\text{mm}^3$) aumentando risco de sangramento e aumento das enzimas aspartato transaminase e alanina transaminase (AST/ALT) indicando dano tecidual, mais frequentemente hepático, tanto nas formas leves quanto graves, mas com níveis mais elevados nas formas graves (Kalayanarooj *et al.*, 1997; Green e Rothman, 2006). Além do TNF- α e INF- γ , a IL-15 parece desempenhar papel importante no desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência de células NK (natural killer) modulando a resposta imune adaptativa celular, regulando a produção de IL-2 pelas células dendríticas, um importante fator de crescimento para os linfócitos T (Zhao e French, 2013). Além disso uma interleucina de ação classicamente anti-inflamatória a IL-10 tem sido apontada como fator preditivo de óbito na infecção por dengue por seu papel imunossupressor (Chareonsirisuthigul, Kalayanarooj e Ubol, 2007; Tsai *et al.*, 2013).

Apesar da infecção por dengue não ter preferência por faixa etária, formas mais graves da doença afetam, sobretudo, as crianças e os velhos, os quais apresentam maior índice de hospitalização e letalidade (Garcia-Rivera e

Rigau-Perez, 2003). De fato a forma hemorrágica da dengue (DHF) e o choque sintromico induzido por dengue (SCD), têm probabilidade muito maior de ocorrer em crianças e velhos (Guzman *et al.*, 2002).

1.3. Resposta Imune à Infecções Virais durante o Envelhecimento.

O envelhecimento pode ser caracterizado para fins didáticos como um processo envolvendo três estágios: no primeiro estágio processos decorrentes das reações metabólicas produzem inevitavelmente substâncias tóxicas que estão associadas às reações químicas que mantêm a vida (um exemplo típico é o estresse oxidativo induzido por radicais livres); no segundo estágio estabelece-se algum dano decorrente do fato de que parte dessas substâncias não pode ser removida, acumulando-se ao longo do tempo; no terceiro estágio esse dano acumulado aciona mudanças patológicas através de alterações diretas (que interferem com o metabolismo) ou de ações indiretas decorrentes da inadaptação dos processos de reparo que acabam por permitir danos colaterais (Zealley e De Grey, 2012).

No que concerne ao sistema imune o conceito de imunossenescência refere-se à mudanças na resposta imune inata e adaptativa relacionadas à idade, disparadas por patógenos externos ou antígenos autólogos, que comprometem tanto as respostas celulares quanto humorais (Castelo-Branco e Soveral, 2013). A resposta adaptativa parece, entretanto mais comprometida do que a resposta imune inata. Um exemplo disso é o que acontece com as células T de memória. Células T de memória em condições homeostáticas desenvolvem uma robusta linha de defesa contra a reinfecção por patógenos previamente encontrados ou contra a infecção por patógenos semelhantes (não necessariamente idênticos).

Isso só é possível por conta do fato de que múltiplos clones de células com afinidades ligeiramente diferentes são produzidos dando origem a células T com certo grau de diversidade (Wensveen *et al.*, 2013). Na infecção secundária por VDEN sorotipo 2 por exemplo encontrou-se 30 diferentes epítomos em células T, sendo 9 deles em células CD4+, e 21 outros em células CD8+. Enquanto as células CD8+ tinham como alvo preferencial proteínas não estruturais (NS3 E NS5) os linfócitos CD4+ reconheciam componentes virais do

envelope, do capsídeo e a proteína não estruturais NS1. Esses alvos do linfócito T CD4⁺ eram partilhados com linfócitos B. Consistente com isso uma grande proporção dos linfócitos CD4⁺ exibiam características de linfócitos auxiliares (expressando a quimiocina CXCR5, e produzindo IL-21 ou IFN- γ) sugerindo sua interação com linfócitos B in vivo.

O envelhecimento está associado à resposta imune alterada particularmente no que concerne a defeitos intrínsecos das células T CD8⁺ tornando-a limitada frente à infecções virais (Brien *et al.*, 2009; Jiang, Fisher e Murasko, 2013). De fato esses autores demonstraram que embora a proliferação de linfócitos T frente à infecções virais não se distinga daquela de animais jovens, a percentagem de linfócitos T secretando IFN- γ nos camundongos velhos é significativamente menor do que nos animais jovens. Como se sabe, interferons do tipo I oferecem resistência à infecção viral e a regulação da resposta imune e o comprometimento de sua secreção durante o envelhecimento compromete a resposta à infecções virais (De Veer *et al.*, 2001; Sadler e Williams, 2008). De fato o VDEN é suscetível ao tratamento com interferon in vivo e in vitro e em modelo murino, animais com déficits na via de sinalização por interferon tem maior mortalidade após infecções experimentais por VDEN do que camundongos selvagens (Johnson e Roehrig, 1999).

Soma-se a isso o fato de que durante o envelhecimento há igualmente uma diminuição da resposta do centro germinativo dos folículos comprometendo a função de linfócitos foliculares auxiliares (T-follicular help cells - Tfh). Nessa região os linfócitos Tfh auxiliares CD4⁺ ajudam na sobrevivência e selecionam sinais para os linfócitos B do centro germinativo deixarem os folículos e se tornarem células B de memória, que uma vez circulantes provem proteção contra reinfecções (Linterman, 2013). O comprometimento da resposta imunológica humoral por essa e outras alterações moleculares que comprometem a função dos linfócitos B durante o envelhecimento contribui pelo menos em parte para o aumento da severidade e a frequência das reinfecções (Blomberg e Frasca, 2013)

Além disso, tem sido demonstrada estreita relação entre mecanismos imunológicos e oxidativos sugerindo que a resposta imune alterada pode estar associada à resposta oxidativa alterada (Valero *et al.*, 2013). De fato esses

autores demonstraram *in vitro* que os monócitos obtidos de crianças e velhos quando infectadas por qualquer sorotipo do VDEN (1 a 4), apresentam respostas oxidantes (nitrérgica) e antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione reduzida) diminuídas, quando comparada a monócitos em culturas provenientes de adultos. Coerente com isso é o fato de que a infecção por VDEN sorotipo 2 altera os níveis intracelulares da glutathione e que sua administração exógena inibe a multiplicação viral através da modulação do fator nuclear kappa B (NFκ-B) revertendo o estresse oxidativo e a lesão hepática associada à infecção (Wang, J. *et al.*, 2013). O NF-κB é um fator de transcrição, envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória, principalmente na resposta linfóide.

Outro aspecto desse conceito relacionado à imunossenescência diz respeito às disfunções mitocondriais que também são vulneráveis ao estresse oxidativo (Wang, X. *et al.*, 2013). Mitocôndrias são organelas multifuncionais com papéis diversos incluindo a produção e distribuição de energia, apoptose e resposta imune do hospedeiro, o que a torna do ponto de vista evolutivo uma peça essencial para evitar a invasão de microrganismos, mas ao mesmo tempo a transforma em alvo preferencial de patógenos invasores incluindo o VDEN (Lu e Liao, 2011; Anand e Tikoo, 2013). De fato uma proteína de membrana do VDEN (proteína M) permeabiliza diretamente as membranas mitocondriais, disparando a morte da célula hospedeira por apoptose (Brabant *et al.*, 2009). Além disso, detectou-se após infecção de células de camundongo Hepa 1-6 pelo VDEN, a expressão de uma família de proteínas denominada de ISG12 por ativação de um dos genes associados à síntese de IFN 1 (o gene ISG12b2). Esse gene estimulado por IFN está localizado na membrana mitocondrial interna e sua expressão induz a morte celular associada à infecção por vírus (Lu e Liao, 2011). Tornou-se aparente a partir de análise bioquímica e funcional de células infectadas por VDEN, que a proteína associada ao gene ISG12b2 é expressa em grande quantidade após a infecção. Como se trata de uma proteína da membrana mitocondrial que quando tem uma superexpressão induz a liberação de citocromo C, altera o potencial de membrana mitocondrial, ativa as caspases 9, 8 e 3 foi sugerido que a morte da célula hospedeira está associada a esse evento (Lu e Liao, 2011).

Por conta do fato de que os linfócitos T tem o seu perfil imunológico alterado durante as formas graves de infecção pelo VDEN, e sua maior mobilização e imunodisponibilidade tem sido associada ao exercício físico (Spielmann *et al.*, 2011), resolvemos investigar possíveis alterações da resposta imune à infecção por VDEN em animais exercitados e sedentários. Para delinear as variáveis envolvidas nessa comparação é útil rever brevemente como a prática regular de exercícios influencia a resposta imune durante o envelhecimento.

1.4. Exercício Físico, Ambiente Enriquecido, Envelhecimento e Resposta Imune.

O exercício pode promover mudanças no sistema imune de curto e longo prazo qualquer que seja a idade de quem o pratica e isso está relacionado à natureza, duração, intensidade e regularidade, assim como a outros fatores que afetam suas interações com o sistema imune, por exemplo, o status nutricional e o estresse (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011). Após exercício agudo ocorre alteração da resposta imune inata e isso inclui a mobilização de neutrófilos, de monócitos, de células dendríticas e de células NK e a magnitude e duração desse evento depende da duração e da intensidade do exercício (Woods *et al.*, 1998; Peake, 2002; Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011). A imunidade adquirida é igualmente afetada pelo exercício, havendo consenso de que o exercício agudo também provoca uma resposta de mobilização bifásica de linfócitos B e T dependente da intensidade e da duração do exercício (Shek *et al.*, 1995; Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011).

O ambiente enriquecido do ponto de vista experimental foi desenhado para mimetizar em modelos animais o estilo humano de vida ativa. Proporcionado por estímulos decorrentes de interações sociais, somato-motoras e visuo-espaciais, com um forte componente de exercício voluntário em rodinhas de correr, túneis, cordas, pontes e brinquedos que são renovados periodicamente. Tem sido demonstrado que animais que crescem nesse ambiente em comparação com aqueles que vivem sedentários em gaiolas padrão de laboratório, melhoram a fagocitose e quimiotaxia de macrófagos, a proliferação e quimiotaxia de linfócitos, aumentam a atividade de células NK, e

modulam os níveis de TNF α e IL-2. Além disso, mostram decréscimo nos níveis do estresse oxidativo associado à inflamação reduzindo os níveis de glutathione oxidada, xantina oxidase assim como da expressão de receptores toll-like 2 e 4 em células CD4⁺ e CD8⁺, e aumentando a atividade da glutathione reduzida, glutathione peroxidase e catalase (Arranz *et al.*, 2010). Esses efeitos são observados tanto em animais jovens quanto em idosos mas o impacto dessas mudanças induzidas pelo ambiente enriquecido é maior no sistema imune senescente (Arranz *et al.*, 2010).

Há agora um conjunto de evidências inequívocas de alterações importantes no sistema imune senescente. Dentre aquelas, destacam-se as alterações nas subpopulações de células T, no padrão de citocinas secretadas, na capacidade de replicação celular e na produção de anticorpos, criando um ambiente pro-inflamatório associado à diminuição da capacidade de resposta a antígenos novos (De Araújo *et al.*, 2013). De fato as células T senescentes se acumulam com a idade diminuindo o repertório de células T imunodisponíveis (“naive”) aumentando os riscos de infecção, enquanto que o exercício físico contribui para minimizar essa alteração (Spielmann *et al.*, 2011).

Realmente indivíduos com estilo de vida sedentário mostram valores plasmáticos elevados para marcadores inflamatórios como a IL-6 e proteína C reativa, independente da presença de obesidade (Fischer *et al.*, 2007). Esses achados são coerentes com o conceito de que o comprometimento funcional do sistema imune (e de outros sistemas) relacionado ao envelhecimento é decorrente pelo menos em parte do estresse oxidativo e da inflamação (De La Fuente e Miquel, 2009). Nesse sentido indivíduos que se exercitam regularmente desenvolvem resposta anti-inflamatória aumentando os níveis circulantes de receptores antagonistas de IL-1 e IL-10 (Walsh, Gleeson, Pyne, *et al.*, 2011) reduzindo o impacto inflamatório associado ao estilo de vida sedentário e ao envelhecimento.

A questão que permanece por ser respondida, entretanto, é a de como medir as mudanças no sistema imune associadas ao exercício regular e ao envelhecimento diante de um processo infeccioso com repetidas infecções como é o caso da dengue, sem empregar modelos experimentais imunocompetentes? Tal como previamente mencionado os mecanismos fisiopatológicos associados às formas severas da infecção pelo VDENV

constituem uma história inacabada e isso ocorre em grande parte por conta do fato de não estarem disponíveis modelos experimentais imunocompetentes que mimetizem tais mecanismos (Bordignon *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2009). Assim, um dos objetivos do presente trabalho é implantar modelo murino imunocompetente para o estudo da infecção por VDEN.

1.5. Modelos Murinos de dengue.

O desenvolvimento de modelos animais de infecção pelo vírus da dengue e da doença relacionada tem sido um desafio intransponível por conta de que o VDEN não infecta naturalmente espécies não humanas. Primatas não humanos sustentam a replicação viral em tipos celulares relevantes e desenvolvem resposta imune robusta, mas não desenvolvem os sintomas da doença (Clark *et al.*, 2013). Em contraste modelos murinos imunodeficientes infectados com VDEN obtidos de soro humano infectado (Balsitis *et al.*, 2010; Fagundes *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011) ou imunocompetentes infectados com variedades de VDEN adaptados para o camundongo (Costa *et al.*, 2012; Velandia-Romero, Acosta-Losada e Castellanos, 2012) podem mostrar sinais de doença severa. Camundongos com sistema imune experimentalmente alterado para mimetizar o sistema imune humano denominados de modelos murinos humanizados, (Mota e Rico-Hesse, 2011) são compatíveis com a replicação viral sustentada e mostram alguns sinais de doença. Modelos murinos imunocompetentes tem se mostrado resistentes a infecção por VDEN por conta da habilidade de sua resposta imune inata promover de forma eficiente o clearance viral; entretanto dependendo da carga viral e do genótipo do sorotipo viral os animais podem desenvolver sinais hemorrágicos após a infecção (Amorim *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2012). Ver para revisão (Zompi e Harris, 2012; Guabiraba e Ryffel, 2013).

Para estudar a influência do ambiente e da idade sobre o curso temporal da infecção por VDEN em modelo murino imunocompetente desenhamos dois experimentos empregando infecções múltiplas. No primeiro, investigamos o impacto de dois regimes distintos de múltiplas infecções sobre o curso temporal da doença empregando múltiplas infecções de um único sorotipo ou múltiplas inoculações de um único sorotipo alternadas com anticorpo heterólogo. No

segundo, investigamos a influência do envelhecimento sobre o curso temporal da doença em animais que cresceram em ambientes distintos. Em ambos os casos, comparamos a evolução da doença em animais que cresceram em ambientes diferentes e que parecem associados a diferentes padrões de resposta imune. No segundo experimento, empregamos somente o regime de múltiplas infecções de um único sorotipo alternadas com inoculações por anticorpo heterólogo.

Esse desenho experimental propiciou a publicação de dois artigos independentes em revistas especializadas de ampla circulação que podem ser encontradas nos anexos 01 e 02 deste documento e os motivos para esse desenho experimental que constam desses manuscritos são explicitados a seguir:

Experimento 01.

Influências ambientais na evolução da doença por dengue acentuada por anticorpo heterólogo.

Evidências clínicas e patológicas obtidas a partir de infecções secundárias pelo vírus da dengue (VDEN) implicam na liberação anormal de citocinas como agente associado ao risco aumentado das formas graves da infecção (Kurane e Ennis, 1992). De fato foram detectados na febre hemorrágica e no choque sindrômico (FHD/CSD) níveis elevados do fator de necrose tumoral (TNF)- α (Vitarana *et al.*, 1991; Hober *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 2004) e a produção dessa e de outras citocinas foi correlacionada com números aumentados de macrófagos/monócitos (De-Oliveira-Pinto *et al.*, 2012), que são células fagocíticas potentes e alvos primários para infecção por VDEN (Kangwanpong, Bhamarapavati e Lucia, 1995; Jessie *et al.*, 2004). Essas células expressam as três classes de FCyR tornando-as particularmente propensas a entrada do VDEN em forma de complexos imunes vírus-anticorpo (Mathew e Rothman, 2008). Além disso, estudos recentes demonstraram que células T de memória específicas para o VDEN originárias a partir de uma infecção prévia respondem aos sorotipos heterólogos do VDEN com um perfil de citocinas alterado e que o nível de expansão e ativação dessas células de memória durante uma infecção aguda de VDEN correlaciona-se com a

gravidade da doença (Rothman, 2010). Soma-se a isso a reatividade cruzada significativa entre os sorotipos VDEN em células T CD8⁽⁺⁾ com sinalização diferencial dos receptores das células T após estimulação com peptídeos virais homólogos e heterólogos (Friberg, Bashyam, *et al.*, 2011). A entrada do VDEN é facilitada pela fagocitose de macrocomplexos imunes através de receptores Fc dos monócitos (Daughaday *et al.*, 1981). Além disso foram detectados complexos imunes circulantes e a ativação do complemento durante o período de febre, com hemorragia ou perda de plasma, e/ou insuficiência circulatória em pacientes com FHD/CSD (Ruangjirachuporn, Boonpucknavig e Nimmanitya, 1979; Wang *et al.*, 2006).

Em áreas endêmicas, onde a incidência de dengue hemorrágica permanece elevada e mosquitos vetores são abundantes, ocorrem múltiplas infecções podendo envolver diferentes sorotipos (Gubler e Meltzer, 1999; Thomas, Strickman e Vaughn, 2003; Suaya *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo a análise de hospitalizações repetidas motivadas por dengue mostraram que pelo menos 10% dos pacientes readmitidos por dengue, podem corresponder a uma terceira ou quarta infecção, com todas as admissões subsequentes devido a uma infecção secundária por dengue (Gibbons *et al.*, 2007). Por conta de que a maioria das infecções por dengue são assintomáticas, é razoável supor que um número de pacientes provenientes de áreas endêmicas, hospitalizados com formas graves da doença, podem ter sido expostos a várias infecções. Assim, comparamos os resultados de dois modelos diferentes de infecção por VDEN: 1) inoculações seriais induzidas com um único sorotipo (IUS) e 2) inoculações múltiplas de um único sorotipo acentuadas por anticorpo heterólogo (ICAH). Foram utilizados fêmeas adultas de camundongos suíços albinos para ambos os modelos de inoculação.

A motivação que nos levou a investigar a possível influência do ambiente sobre o curso temporal da doença nesses animais decorreu da constatação em estudo recente em nosso laboratório de que o ambiente enriquecido (AE) aumenta a mobilização de células T durante infecções virais (De Sousa *et al.*, 2011) e que um maior número de células T mobilizadas, pode contribuir para o aumento dos níveis de citocinas associados à formas graves da infecção por dengue (Boonnak *et al.*, 2011). Assim testamos a hipótese de que o

enriquecimento ambiental iria exacerbar os sintomas clínicos e a mortalidade na infecção por dengue.

Experimento 02.

Envelhecimento e enriquecimento ambiental exacerbam a resposta inflamatória na infecção por dengue acentuada por anticorpo heterólogo em modelo murino imunocompetente.

Estudos recentes demonstram que as células T de memória, específicas para o vírus da dengue (VDEN) associadas a uma infecção primária respondem com produção de citocinas alteradas para outros sorotipos do vírus e que o nível de ativação e expansão dessas células de memória durante a infecção aguda está associada à gravidade da doença (Rothman, 2010). Os anticorpos heterólogos facilitam a infecção pelo VDEN promovendo a entrada do vírus através de receptores Fc, um processo de agravamento reconhecido como doença acentuada por anticorpo heterólogo (Halstead, 2003), e a administração passiva de anticorpos heterólogos anti-VDEN é suficiente para acentuar a infecção pelo VDEN e agravar a doença em camundongos (Balsitis *et al.*, 2010). Assim, a reatividade cruzada e a expansão de células T específicas pra o VDEN durante as infecções primárias e secundárias agudas (Friberg, Bashyam, *et al.*, 2011), pode contribuir para maior viremia e níveis excessivos de citocinas observadas na doença grave (Boonnak *et al.*, 2011).

Vários trabalhos têm usado camundongos nos estudos de dengue empregando linhagens imunocompetentes, imunocomprometidas e humanizadas para analisar os vários aspectos da infecção, mas o desenvolvimento de um modelo animal apropriado para infecção por VDEN tem sido dificultada pelo nível reduzido ou ausência de replicação de sintomas clínicos nos camundongos imunocompetentes ou em primatas não humanos (Zompi e Harris, 2012). No experimento 01, descrevemos um desenho experimental para infecção por VDEN acentuada por inoculações com anticorpo heterólogo em um modelo de camundongo imunocompetente submetido ao regime de múltiplas infecções tentando mimetizar o que ocorre em áreas endêmicas onde a incidência de dengue hemorrágica permanece elevada, os mosquitos vetores são abundantes e múltiplas infecções envolvem

diferentes sorotipos (Gubler e Meltzer, 1999; Thomas, Strickman e Vaughn, 2003; Suaya *et al.*, 2009). De fato, pelo menos 10% de admissões hospitalares repetidas por dengue correspondem a uma terceira ou quarta infecção com todas as readmissões resultantes de infecção secundária por dengue (Gibbons *et al.*, 2007).

No presente ensaio, tomamos como ponto de partida demonstrações prévias de que idosos fisicamente ativos demonstram menor declínio funcional da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T e B do que idosos sedentários pareados por idade (Simpson e Guy, 2010). Baseados nessa premissa decidimos testar a hipótese de que a infecção por dengue acentuada por anticorpo heterólogo produziria doença mais severa em camundongos velhos mantidos em ambiente enriquecido do que em camundongos pareados por idade mantidos no ambiente padrão das gaiolas de laboratório e que a aplicação de glicocorticoides poderia contribuir para reduzir a severidade dos sintomas e o número de mortes. Baseado em descrições prévias de que o número de óbitos e a taxa hospitalização após infecção por dengue são maiores em pacientes idosos do que em pacientes jovens (Guzmán *et al.*, 2002), predissemos que a mortalidade após a doença acentuada por anticorpo heterólogo seria maior em camundongos velhos (18 meses de idade) do que em adultos maduros (9 meses de idade).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Estudar os efeitos do ambiente enriquecido e da idade sobre o curso temporal da infecção pelo vírus da dengue em modelo murino imunocompetente.

2.2. Específicos

- Implantar modelo de infecções múltiplas por VDEN3 genótipo III acentuadas por anticorpo heterólogo anti-VDEN2 em fêmeas adultas de camundongo da variedade suíça albina de 9 e 18 meses de idade.

- Investigar através de ensaios comportamentais e histopatológicos a influência do ambiente sobre o curso temporal da inoculação por dengue (genótipo III) acentuada por anticorpo heterólogo anti-VDEN2 decorrente de múltiplas infecções.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Experimento 01.

Utilizamos fêmeas adultas de camundongos suíços obtidos a partir de uma colônia do Centro de Cuidados Animais do Instituto Evandro Chagas; os animais foram tratados em conformidade com “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institute of Health). Os camundongos foram mantidos em ciclos de 12h claro-escuro, com temperatura ambiente em torno $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ tendo livre acesso a alimentação e água nos andares.

3.1. Grupos experimentais e inoculações.

Realizamos inoculações em série por via intraperitoneal (i.p) seguindo um dos dois protocolos experimentais. De acordo com o primeiro protocolo (AP: n = 13; AE: n = 15) todos os animais receberam injeções seriais i.p. de um único sorotipo com homogeneizado cerebral infectado contendo 0,014-0,087 cópias virais/ml de VDEN3 (genótipo III) (grupo IUS) até o aparecimento dos sintomas clínicos. De acordo com o segundo protocolo (AP: n = 18; AE: n = 16), todos os sujeitos receberam inoculações i.p com o homogeneizado cerebral infectado contendo o mesmo número de cópias virais de VDEN3 (genótipo III), uma vez por dia durante seis dias; posteriormente os camundongos foram inoculados i.p com o soro hiperimune anti-VDEN2 que continha os anticorpos anti-VDEN2 (diluição 1:32) em dias alternados mimetizando a doença acentuada por anticorpo heterólogo. Os animais foram sacrificados quando exibiram sinais clínicos de doença ou quando a atividade de estocagem de alimento tornou-se menor do que 40% tendo em conta o período pré-inoculação, em duas avaliações semanais consecutivas. Indivíduos do grupo controle receberam volumes e diluições equivalentes de homogeneizado cerebral não infectado e de soro hiperimune 24h em dias alternados. No dia 38^o dia pós-inoculação (dpi), os sujeitos do grupo ICAH receberam uma única inoculação de glicocorticoide (26 mg/kg, de uma mistura de 1:1 acetato e fosfato de betamesona) para reduzir a taxa de mortalidade a partir da diminuição da resposta inflamatória, medindo-se o impacto de glicocorticoides sobre as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meyer. Esta

combinação de glicocorticoides torna-se eficaz 30 minutos após inoculação e permanece ativa durante quatro semanas.

Foram utilizadas fêmeas adultas de camundongos da variedade albino suíça alojadas desde o desmame, sob condições empobrecidas (gaiolas padrão) ou enriquecidas. As gaiolas para manutenção dos animais (Figura 4) do ambiente enriquecido foram montadas com vergalhões de ferro e arame, tinham dois andares, mediam (100 x 50 x 100 cm) e continham brinquedos feitos de diferentes formas e tamanhos, construídos de material plástico, madeira e metal, de cores diferentes que eram substituídos periodicamente em intervalos de 15 dias. Cada gaiola de ambiente enriquecido alojou de 15-20 camundongos. Água e comida eram oferecidas em andares diferentes (superior e inferior), obrigando o deslocamento sistemático para sua obtenção. Os animais do ambiente empobrecido foram alojados em gaiolas de plástico (32 x 39 x 100 cm), sem equipamentos ou brinquedos. Cada gaiola empobrecida alojou de 15-20 camundongos. Todos os animais tiveram acesso *ad libitum* à alimentação e água.

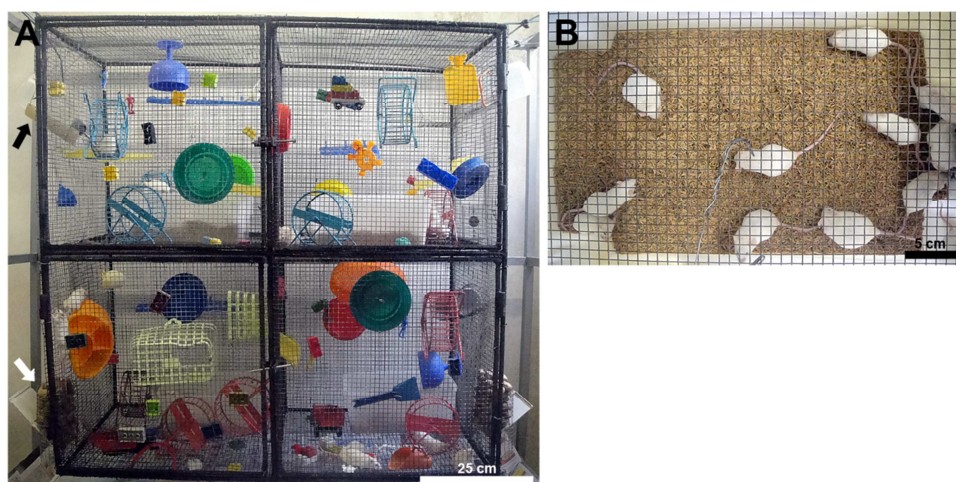


Figura 4. (A) Ambiente enriquecido. (B) Ambiente empobrecido. Seta preta indica a oferta de água no andar superior e seta branca indica a oferta de alimento no andar inferior

3.2. Homogeneizados cerebrais infectados.

Animais neonatos (2 dias de idade) foram intracerebralmente infectados com 10 μ l de sobrenadante de cultura células C6-36 infectadas. Esses sobrenadantes continham 1.33×10^3 ou 7.78×10^3 cp/ml de VDEN3 (genótipo

III) obtidas a partir de amostras de soro humano (casos ROND 2929 e ROND 3115, respectivamente). Ao apresentarem os sinais clínicos da infecção, os animais foram sacrificados imediatamente e congelados em freezer -80° C. Posteriormente, o tecido cerebral (0,2g/animal) foi macerado e misturado com 0,8ml contendo 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. A suspensão era centrifugada a 10.000 g por 15 minutos à temperatura ambiente (16° C). A carga viral (CV) nos diferentes tecidos de camundongos adultos de diferentes grupos experimentais foi avaliada pela reação de cadeia de polimerase em tempo real (do inglês “real time-polymerase chain reaction” RT-PCR) quando os sintomas clínicos se tornaram aparentes.

3.3. Atividade de remoção de ração (Burrowing).

A Figura 5 ilustra o aparato onde os camundongos desenvolvem a atividade de burrowing (remoção dos pellets de ração para fora do tubo). Semanalmente em dias alternados (de 9h às 11h da manhã), antes da inoculação e a partir do segundo dia após a primeira infecção (2 d.p.i) até o dia do sacrifício, cada animal foi colocado em uma gaiola de plástico (32 cm x 39 cm x 16,5 cm) contendo um tubo de Poli Cloreto de Vinila (PVC) (18 cm de comprimento x 7,5 cm de diâmetro) contendo 100 g da ração normal (pellets). Esse tubo tinha uma das extremidades aberta e elevada a 3 cm do chão permitindo que o camundongo em teste removesse a ração do tubo. Após o período de teste, a ração remanescente no tubo foi pesada e o camundongo devolvido a sua gaiola. A remoção de alimento (burrowing) foi escolhida para indicador de comportamento doentio por ser uma tarefa etológica que é reduzida frente à inflamação sistêmica (Cunningham *et al.*, 2009).

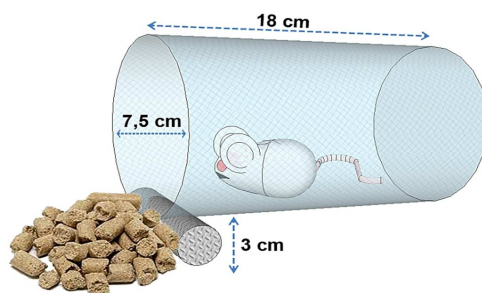


Figura 5. Tubo de PVC para medida de remoção de ração (burrowing).

3.4. Atividade locomotora exploratória em campo aberto (open field).

A Figura 6 ilustra o equipamento empregado para medida da atividade locomotora em campo aberto. O aparato consiste de uma caixa de madeira cinza (aglomerado revestido) (30 cm x 30 cm x 40 cm) com o chão dividido em 9 quadrados de 10 cm x 10 cm. Depois de uma semana antes da inoculação e entre o segundo d.p.i e o dia do sacrifício, cada animal foi colocado no centro da arena e mantido no aparelho durante 5 minutos, tal como anteriormente descrito (Kinoshita *et al.*, 2009). O campo aberto (open field) é um teste sensível utilizado com sucesso na detecção de comportamento doentio após uma variedade de infecções virais, incluindo a dengue (De Miranda *et al.*, 2012). Uma câmera de vídeo ligada a um computador foi fixada a 2 metros acima do campo aberto e usado para gravar cada sessão de treinamento para posterior análise com o software AnyMaze (Stoelting). Foram analisadas as seguintes variáveis: distância percorrida (m), velocidade média (m/s), linhas cruzadas e tempo imóvel (s). Depois de cada teste o campo aberto era limpo com 70% de etanol (ver vídeo no cd).

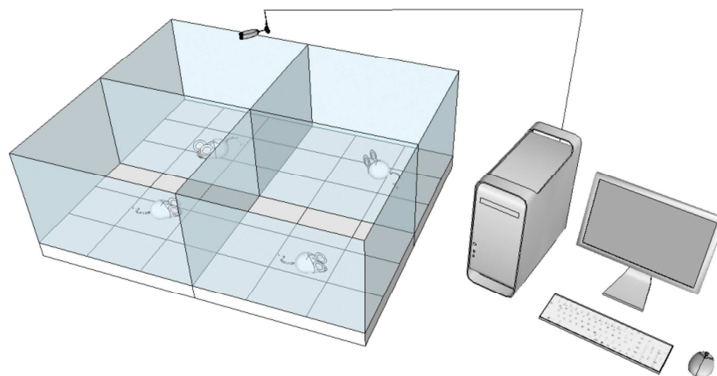


Figura 6. Equipamento para medida da atividade locomotora em campo aberto. A câmera acoplada ao computador registra e estoca as imagens colhidas durante as sessões de medida. O processamento das imagens é feita off-line com auxílio de software (ANYMAZE, Stoelting Inc.).

3.5. Caixa Claro/Escuro (CCE).

A Figura 7 ilustra o equipamento utilizado para medir o padrão de ocupação dos ambientes escuro e iluminado da caixa de teste. Esse teste explora a aversão inata de roedores por áreas muito iluminadas e o comportamento exploratório espontâneo dos animais. O modelo é baseado na observação de que mesmo sendo animais noturnos, roedores tendem naturalmente a explorar o ambiente incomum. Nesse sentido uma alteração na ocupação da área iluminada normalmente evitada o comportamento explorador pode ser útil (Hascoët, Bourin e Nic Dhonnchadha, 2001). O aparato foi formado por uma caixa retangular (46x27x30 cm), dividida em duas áreas de tamanhos diferentes, a menor área é 1/3 da área total da caixa (18x27 cm), pintada de preto e coberta com uma tampa preta feita com o mesmo material do aparato; enquanto a área maior (27x27 cm) é pintada de branco e permanece aberta. Entre as duas áreas há uma porta no centro da divisória medindo 7,5x7,5 cm. Realizado uma vez por uma semana antes e após as inoculações até o dia do sacrifício do animal. O teste é feito colocando-se o animal no centro da área maior (campo aberto), durante 5 minutos, sendo livre para se mover entre as duas áreas (clara/escura), através da porta. A câmera de vídeo, a dois metros acima do aparato, conectada a um computador, registrou cada sessão de amostragem para posterior análise pelo software ANYMAZE (Stoelting). Os seguintes parâmetros foram analisados: distância total percorrida e tempo total imóvel no aparato; número de entradas, tempo gasto, distância percorrida e tempo imóvel na zona clara; número de entradas e tempo gasto na zona escura.

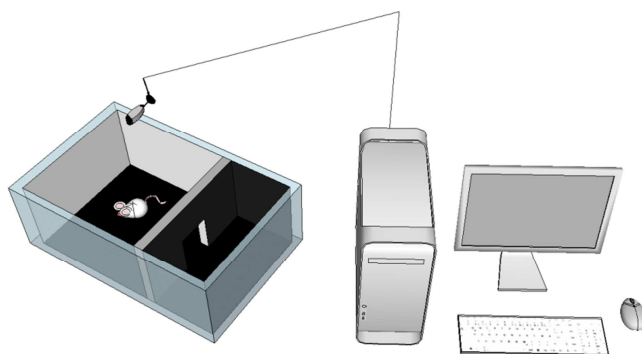


Figura 7. Equipamento para medida do tempo de ocupação dos espaços claro e escuro.

3.6. Histologia e imuno-histoquímica.

Após os testes comportamentais todos os animais doentes que mostraram redução de mais do que 60% na remoção de comida por duas sessões consecutivas (4 medidas) ou com o aparecimento dos sintomas clínicos foram sacrificados com sobredose de anestésico i.p. (tribromoetanol a 1% na dose de 0,01ml/g de peso corporal) e perfundidos por via transcardíaca com solução salina heparinizada, seguido por paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2 - 7,4). Fígado e pulmões, de três animais de cada grupo foram processados para corte em parafina e secções de 10µm de espessura foram montadas em lâmina, desparafinizadas em xileno e desidratadas em álcoois para coloração com hematoxilina-eosina ou imunomarcadas para detectar a proteína NS1 do vírus VDEN3 (ab41616, diluição 1:20 ABCAM, USA), e linfócitos T (CD3) e B (CD20). Os achados histopatológicos deste experimento são apresentados em conjunto com os do segundo experimento para tornar o texto menos repetitivo.

3.7. Imuno-histoquímica para Linfócitos T e B.

Secções transversais seriadas a 3µm de espessura foram obtidas em micrótomo e montadas em lâminas de vidro previamente tratadas com poli-D-lisina (Sigma Chemical Co, USA). A seguir foram desparafinizadas em xileno e desidratadas em álcool em uma série decrescente. A recuperação antigênica foi realizada utilizando uma panela de pressão (PASCAL[®], DakoCytomation, USA) em tampão citrato (10 mM, pH 6.0). Depois de lavadas em PBS, as secções foram imersas em 0.3% de peróxido de hidrogênio durante 5 minutos para bloquear a atividade da peroxidase endógena e bloqueadas para sítios inespecíficos com caseína durante 10 minutos. As secções foram em seguida incubadas numa câmara úmida escura com anticorpos primários monoclonais contra CD3 (clone SP7, diluição 1:400, DakoCytomation, USA) ou CD20 (clone L26, diluição 1:600, DakoCytomation, USA) durante 30 minutos, em seguida, as secções foram imersas em solução de anticorpo secundário biotinilado com complexo de peroxidase-biotina-estreptavidina, durante 20 minutos em temperatura ambiente (DakoCytomation, EUA). Os sítios imunomarcados foram visualizadas com diaminobenzidina e contrastadas com hematoxilina de Harry.

Tal como no caso da histopatologia os resultados deste ensaio são apresentados em conjunto com os resultados do experimento 02.

3.8. Imunomarcação para micróglia.

Secções dos cérebros cortadas a 70µm de espessura, foram pré-tratadas com ácido bórico 0.2M (pH 9,0) a 65-70°C durante 1 hora flutuando livremente, com a finalidade de promover a recuperação antigênica. As secções foram incubadas com um anticorpo policlonal anti-IBA-1 para imunomarcação de macrófagos e micróglia (anti-Iba1, #019-19741; Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan) na concentração de 2 µg/ml em PBS. Secções lavadas foram então incubadas durante a noite com anticorpo secundário (cabra anti-coelho, 1:250 em PBS, Vector Laboratories). A peroxidase endógena foi inativada por imersão em 3% H₂O₂ em PBS. Os cortes foram lavados em PBS e transferidos para uma solução contendo o complexo de peroxidase-avidina-biotina (Kit VECTASTAIN ABC; Vector Laboratories) por 1h. O protocolo para revelação dos sítios imunomarcados empregou DAB/níquel/glucose oxidase (Shu, Ju e Fan, 1988). A especificidade da reação foi confirmada omitindo-se o anticorpo primário (Saper e Sawchenko, 2003).

3.9. Extração de RNA.

O RNA viral foi extraído do sobrenadante de cultura de células C6/36 usando o Kit para extração rápida de RNA (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. O PCR quantitativo em tempo real RT-PCR (SYBR - qPCR) - qRT-PCR, foi feito usando o kit comercial (SuperScript III Platinum SYBR[®] Green One-step qRT-PCR, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A reação foi executada para um volume final de 25µl contendo 5µl de RNA viral (1-2 ng/µl), 0,5µl de SuperScript III RT platinum Taq Mix, 0,2µM de cada primer de VDEN (dos Santos *et al.*, 2008), 12,5µl de 2X SYBR de corante fluorescente verde e 1µl de corante ROX. A amplificação foi realizada como segue: 20 min a 50°C, 5 min a 95°C, 45 ciclos de 95°C por 15s, 55°C por 40s e 72°C por 30s.

A curva de fusão foi calculada durante o período de incubação de 60-90°C com a velocidade de captura de 0.2°C/s. Cada amostra foi analisada em duplicata. Os resultados obtidos com o SYBR-qRT-PCR foram expressos como

cópias do genoma/ml baseado na curva padrão construída a partir da amplificação do RNA extraído de células C6/36 infectadas com o VDEN3 da variedade BH692808 (estoque em concentração: 3.1×10^6 cópias do genoma/ml) e diluída de 10^{-1} a 10^{-6} . As estimativas do VL (cópias do genoma viral/ml) nas células C6-36 correspondendo aos casos humanos ROND2929 e ROND 3115 foram utilizadas nas concentrações 1.33 e 1.77×10^3 respectivamente.

Curva Padrão: As curvas padrão foram geradas a partir de diluições seriadas de RNA derivado de alíquotas com títulos virais conhecidos cobrindo uma faixa de 1×10^{-1} a 1×10^{-8} . A curva padrão com oito pontos foi amplificada em duplicata em paralelo com controles para determinar o valor limiar. Valores limiares de cada ciclo da amostra de RNA amplificada foram comparados com curvas padrão externas para determinar a carga viral de cada tecido. A Figura 8 ilustra a sequência experimental adotada no experimento 01.

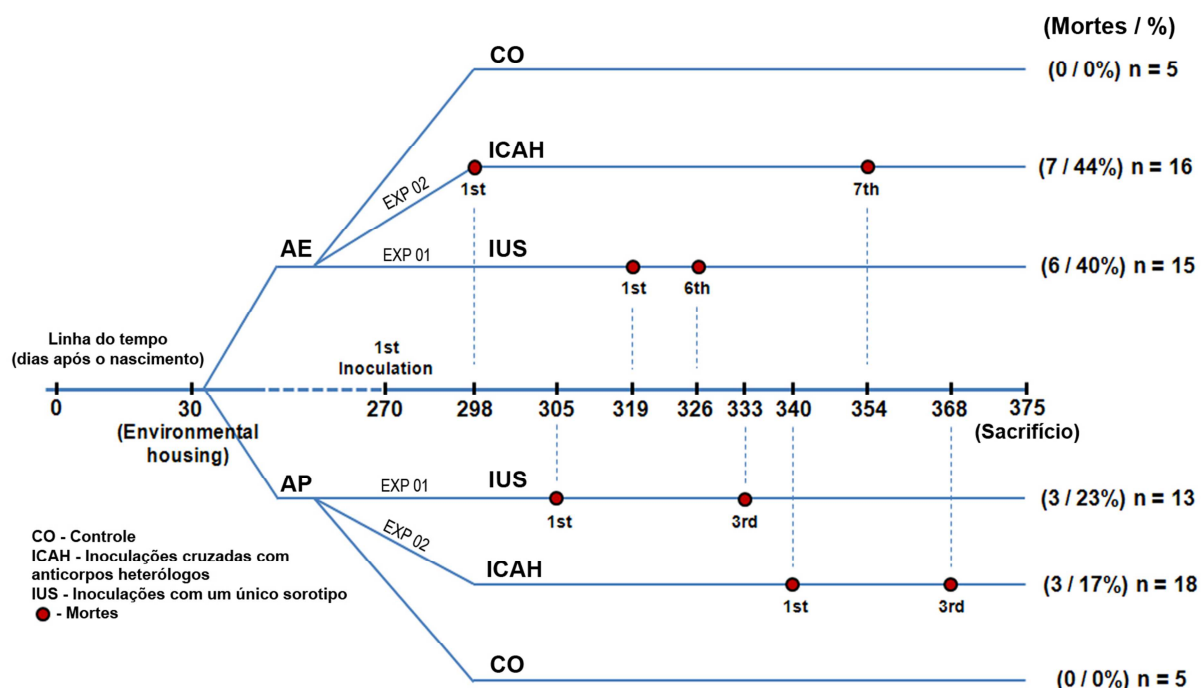


Figura 8. Linha do tempo experimental. Os animais foram alojados em ambientes enriquecido ou empobrecido no 30º dia após o nascimento. Realizamos inoculações i.p em série seguindo um dos dois regimes de inoculações. No primeiro regime (EXP 01), AP n = 13 e AE n = 15, todos os indivíduos receberam diariamente uma série de inoculações i.p de homogeneizado cerebral infectado (inoculações com um único sorotipo - IUS) até o dia do sacrifício. No segundo regime de inoculação (EXP 02), AP n = 18, AE n = 16, todos os animais receberam uma série de injeções i.p de homogeneizado cerebral infectado com número similar de cópias virais do VDEN3 (genótipo III) uma vez ao dia, durante seis dias, e em seguida, a cada dois

dias eram inoculados com soro hiperimune diluído (1:32) contendo anticorpos anti-VDEN2, seguido 24h após por homogeneizado cerebral infectado com VDEN3 (genótipo III) até o dia do sacrifício (inoculações cruzadas com anticorpos heterólogos - ICAH). Os dias de sacrifício eram diferentes em diferentes animais e coincidiu com a presença de sinais clínicos, incluindo dispneia, tremor, postura encurvada, pelo eriçado, imobilidade, paralisia pré-terminal e eventual morte, ou alternativamente, quando a atividade de estocagem de ração reduzia-se abaixo de 40% durante duas medições semanais consecutivas. Indivíduos do grupo controle receberam volumes iguais e diluições de soros hiperimune VDEN2 seguido 24h após por homogeneizado cerebral não infectado. Note que o número de mortes nos grupos AE (IUS = 40%; ICAH = 44%) foi significativamente maior do que nos grupos de AP (IUS = 23%; ICAH = 17%). CO: grupo controle.

Experimento 02.

Tendo em conta que os estudos visando medir a influência do envelhecimento e do ambiente sobre o curso temporal da infecção por DENV obrigam a comparação com o grupo jovem, é inevitável que os métodos empregados nos experimentos 01 e 02 sejam em grande extensão superpostos. Por essa razão, evitamos reproduzir a descrição dos procedimentos experimentais já apresentados recomendando a leitura dos métodos do experimento 01 onde aplicável ao experimento 02.

4. Grupos Experimentais e comitê de ética.

Todos os camundongos foram obtidos da mesma colônia de animais utilizada no experimento 01 a partir do Centro de Cuidados Animais do Instituto Evandro Chagas e os animais foram manipulados de acordo com as recomendações internacionais para experimentação animal (National Institute of Health) e com as normas brasileiras para experimentação animal (CONCEA) ver anexo 03. Um total de oitenta camundongos fêmeas, de 9 meses (N=40) e 18 meses (N=40) de idade foram mantidos em ambiente enriquecido (AE, n=40) ou empobrecido (AP, n=40). Esses animais formaram dois grupos experimentais denominados jovem e velho, com quatro subgrupos (AEV n= 20, AEJ n=20, APV n=20, APJ n=20).

4.1. Alojamento e sequência experimental.

Inoculação: Todos os animais receberam uma série de inoculações contendo número igual de cópias virais de VDEN3 genótipo III seguido 24h após de anticorpo anti-VDEN2 (diluição 1:32). Ver descrição detalhada do

regime de infecções múltiplas acentuada por anticorpo heterólogo no experimento 01. Animais jovens e velhos receberam inoculações aos 270 e 550 dias de vida respectivamente. Os grupos controle receberam homogeneizado cerebral não infectado, seguido de anticorpo anti-VDEN2 24h após. Todos os animais foram sacrificados quando seus sintomas clínicos tornaram-se aparentes, tal como descrito para o experimento 01. A aplicação de glicocorticoides seguiu o mesmo protocolo previamente descrito no experimento 01.

Ver descrição detalhada dos ambientes, ensaios comportamentais, análise histopatológica, imuno-histoquímica e medidas da carga viral por PCR em tempo real em Métodos no experimento 01.

4.2. Imunofluorescência.

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para detecção de antígenos virais nos pulmões, rins, fígado e baço dos animais infectados. Para tanto, secções de pulmões, rins, fígado e baço foram desparafinizadas com Xilol I e II por 20 e 10 minutos, respectivamente. Realizou-se reidratação com bateria de álcool em concentrações decrescentes: 100%, 90%, 80% e 70%, seguindo-se 3 lavagens em PBS, 3 minutos cada. A recuperação antigênica foi feita na Câmara de Pasteur em tampão citrato pH 6 a 95°C por 30 minutos e as secções foram, novamente, lavadas em PBS. A permeabilização foi realizada com Triton X-100 por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de lavagem com PBS e bloqueio de sítios aldeídicos inespecíficos disponíveis com cloreto de amônio 50mM por 30 minutos. A seguir, foram novamente lavadas em PBS. O bloqueio de sítios inespecíficos remanescentes foi feito com IgG-Blocking por 1h e as secções foram incubadas em anticorpo primário policlonal contra a glicoproteína NS1 do VDEN (ab41616, diluição 1:20 ABCAM, USA) durante a noite, seguido de incubação em anticorpo secundário biotinilado por 20 minutos. Após incubação com avidina conjugada com fluoresceína (alexa flúor 488, Molecular Probes) por 15 minutos, e lavadas em PBS, realizou-se a montagem das lâminas em ProLong anti-fading Kit (Invitrogen). Finalmente, as secções foram observadas ao microscópio de fluorescência Axiophot e fotografados com câmera digital AxioCan. Confirmamos a especificidade da

reação omitindo o anticorpo primário (Saper e Sawchenko, 2003). Algumas seções imunomarcadas para antígenos virais empregando imunofluorescência indireta foram contracoloradas com brometo de etila para marcação de DNA. A Figura 9 ilustra um exemplo da imunomarcação para a glicoproteína NS1 do VDENV (em verde) e a contracoloração por brometo de etila (em vermelho) em cortes de pulmão e fígado.

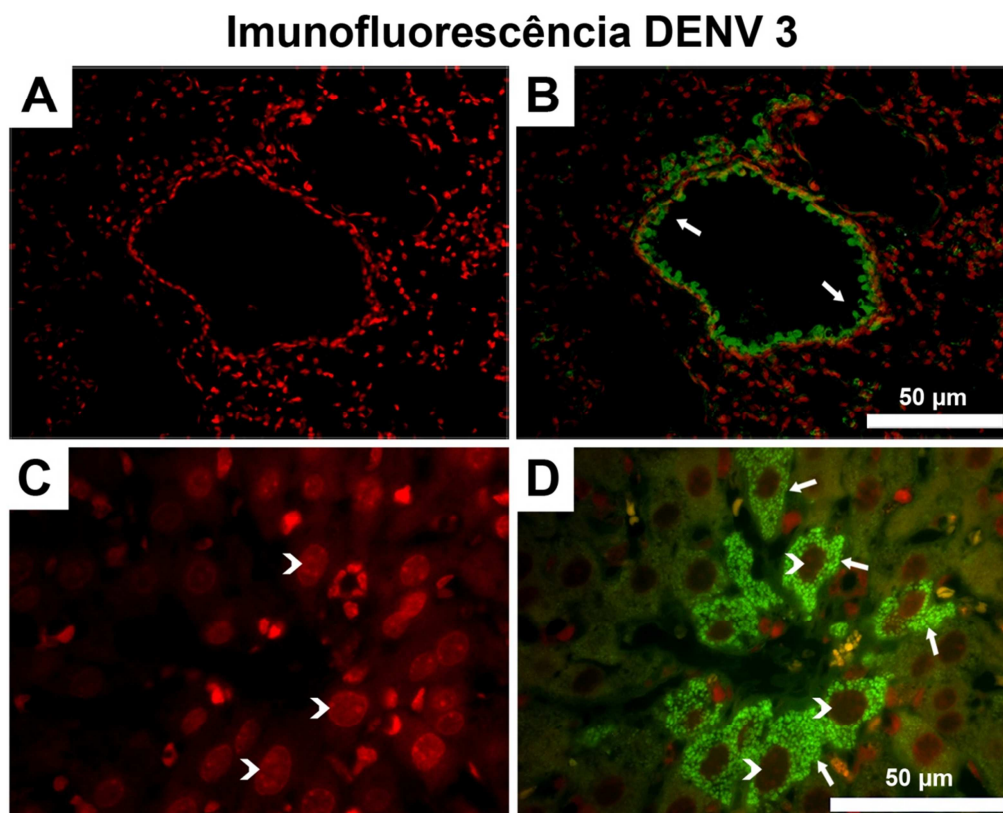


Figura 9. Fotomicrografias de pulmão (A, B) e fígado (C, D) seções de camundongos do AE envelhecidos. Imagens fluorescentes após imunomarcação policlonal de antígenos virais da dengue (verde) contrastadas com iodeto de propídio para a coloração do DNA (vermelho). As setas indicam células infectadas no epitélio bronquiolar no pulmão (B) e hepatócitos no fígado (D). As cabeças de setas indicam o DNA nuclear da das mesmas células após coloração com brometo de etila em cortes de fígado (C, D). A imunomarcação revelada em verde é consequência da escolha do anticorpo secundário biotinilado sobre o qual a avidina marcada com a fluoresceína se liga.

A Figura 10 ilustra em detalhes a sequência experimental do experimento 02. Todos os animais receberam uma série de injeções intraperitoneais de homogeneizado cerebral infectado contendo número de cópias de VDENV3 genótipo III (0.014 - 0.87 cópias do genoma viral/ml) uma vez por dia durante 6 dias. A partir de então, em dias alternados foram inoculados com soro hiperimune contendo anticorpos anti-VDENV2 (diluição 1:32) seguido

24h depois de homogeneizado cerebral infectado contendo similar número de cópias até o aparecimento dos sintomas clínicos, quando foram sacrificados. Camundongos velhos e novos receberam a primeira inoculação no 550º e 270º dias de vida respectivamente. Os dias de sacrifício variaram em função da data de aparecimento dos sintomas de cada qual e esses sintomas incluíram dispneia, tremor, postura encurvada, pelos eriçados, imobilidade, paralisia pré-terminal, choque e morte eventual, ou alternativamente quando a atividade burrowing reduziu-se a 40% do habitual em duas medidas semanais consecutivas. A primeira morte nos grupos velho e jovem ocorreram respectivamente aos 11º e 28º dias após a primeira infecção respectivamente. Animais controle (CO) na receberam iguais volumes de homogeneizado cerebral não infectado e não ocorreram mortes nesse grupo (Figura 10).

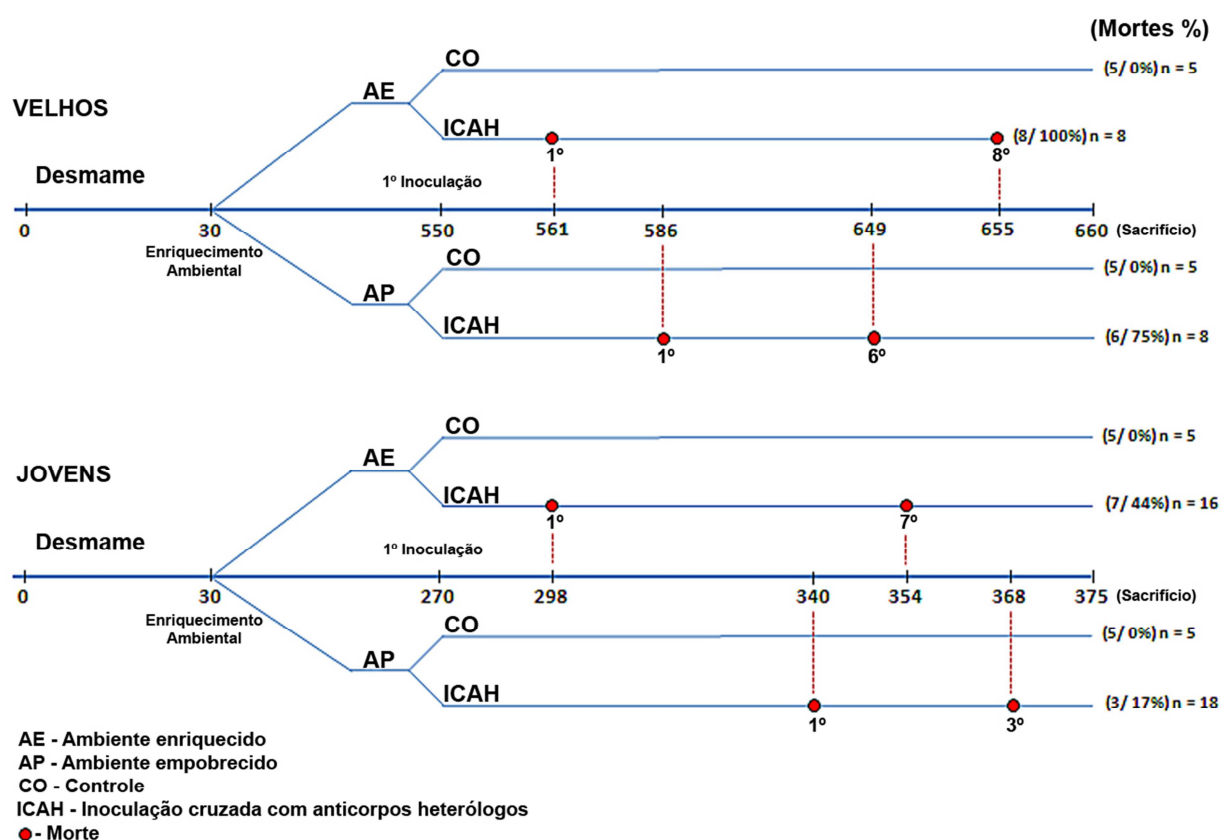


Figura 10. Sequência de inoculações e registro dos óbitos em função do tempo e dos grupos experimentais. Todos os animais foram criados a partir do desmame em um ambiente enriquecido (AE) ou empobrecido (AP). Os animais velhos e jovens receberam a primeira inoculação nos dias 550 e 270, respectivamente. Os dias de sacrifício eram diferentes em diferentes animais e coincidiu com a presença de sinais clínicos ou alternativamente, quando a atividade de estocagem de alimento caiu abaixo de 40% durante duas medições semanais consecutivas. A primeira morte em camundongos idosos e jovens ocorreu respectivamente no 11º e 28º dias após a primeira inoculação. Todos os animais do grupo infectado receberam

uma série de injeções i.p. de homogeneizado cerebral infectado, contendo um número similar de cópias virais de DENV3 genótipo III, uma vez por dia durante 6 dias e, depois, a cada dois dias, eles foram inoculados i.p. com anticorpos anti-VDEN2 (diluição 1:32), seguido 24h mais tarde por homogeneizado de cérebro infectado até o dia do sacrifício (grupos ICAH). Os animais controles (grupos CO) receberam volumes e diluição iguais de soro hiperimune anti-VDEN2 seguido 24h mais tarde por homogeneizado de cérebro não infectado e não foram detectadas mortes nesses grupos.

5. RESULTADOS

5.1 Infecções múltiplas com um único sorotipo em comparação com infecções acentuadas por anticorpo heterólogo: A escolha do modelo.

Com o intuito de estabelecer um modelo murino que apresentasse sinais clínicos evidentes da doença associada à infecção por dengue comparamos dois regimes de inoculações múltiplas: no primeiro empregamos homogeneizado cerebral infectado com VDEN 3 genótipo III e no segundo alternamos o homogeneizado cerebral infectado com o mesmo sorotipo com inoculações de anticorpo heterólogo anti-VDEN2. Para essa comparação realizamos ensaios comportamentais e reconstruímos as curvas Kaplan-Meyer de probabilidade de sobrevivência.

5.2. Ensaios comportamentais.

As atividades de burrowing e open field nos camundongos controle e infectados (Figura 11; ver vídeo no CD) foram realizadas 2 vezes por semana até que mudanças significativas em ambos os testes se tornassem aparentes e isso aconteceu na 7^a ou 8^a semanas pós-inoculação dependendo do regime adotado de infecções (49-56 dias após a primeira inoculação - DPI).

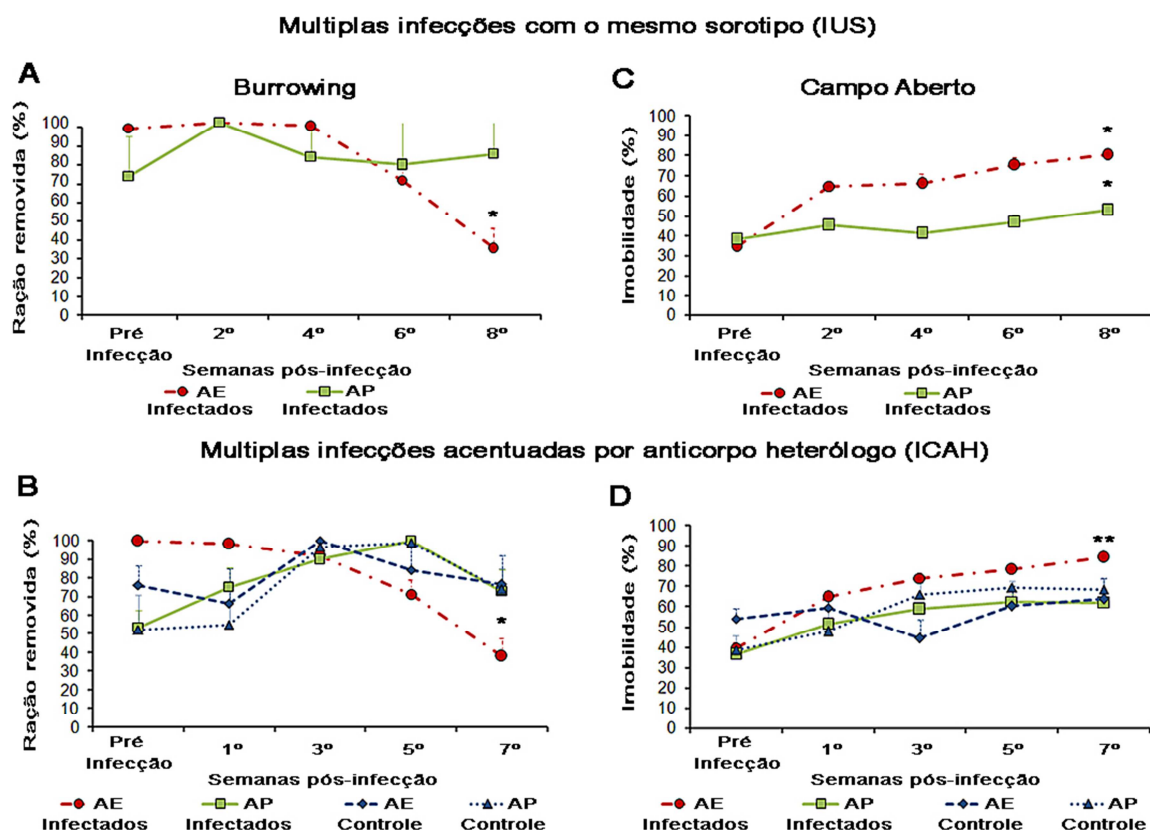


Figura 11. Comportamento doente. Representação gráfica das mudanças comportamentais com as respectivas barras de erro no modelo de múltiplas infecções com o mesmo sorotipo (A e C) ou no modelo de múltiplas infecções com reação cruzada com anticorpos (B e D). Em comparação com o período pré-infecção, o modelo de múltiplas infecções com um único sorotipo DENV 3, mostrou que a porcentagem da ração removida teve uma queda significativa nos animais criados em ambiente enriquecido (A). Em média, os indivíduos do ambiente enriquecido (AE, $n = 15$) submetidos ao modelo de infecção acentuada por anticorpo heterólogo mostraram que em comparação com a pré-infecção a remoção da ração foi reduzida significativamente na sétima semana pós-infecção, enquanto, que os animais do ambiente empobrecido (AP, $n = 13$) não tiveram alteração significativa (B). Nos testes de campo aberto todos os sujeitos que foram submetidos a múltiplas infecções com o mesmo sorotipo (C) ou com múltiplas infecções cruzadas de anticorpos (D) apresentaram alterações significativas na sétima e oitava semana. Os animais do grupo controle não apresentaram alterações significativas. (*) = $p < 0,05$.

Após múltiplas infecções com um único sorotipo (IUS) foi detectada diminuição significativa na estocagem de ração para os animais do AE na oitava semana pós-inoculação (SPI); Figura 11A. As médias e respectivos erros-padrão expressos em valores percentuais para cada um dos grupos testados foram: AE pré-inoculação = $96,82\% \pm 8,21\%$ vs AE 8ª SPI = $35,04\% \pm 9,31\%$; (ANOVA um critério, teste de Bonferroni *a priori*, $p < 0,05$), AP pré-inoculação = $72,31\% \pm 6,94\%$ vs. AP 8ª SPI = $83,75\% \pm 9,9\%$; $p > 0,05$. A partir desses valores torna-se evidente que apenas os animais do ambiente enriquecido submetidos ao regime de múltiplas infecções por um único sorotipo

reduziram significativamente a atividade de burrowing. Os animais submetidos ao regime ICAH do ambiente enriquecido revelaram diferença significativa na quantidade de comida removida uma semana mais cedo (7ª SPI) (AE pré-inoculação = $100\% \pm 2,74\%$ vs AE 7ª SPI = $34,23\% \pm 16,95\%$), expressa uma redução de 65,77% entre um momento e outro (ANOVA um critério, teste de Bonferroni *a priori*, $p < 0,05$), enquanto que os camundongos do AP não reduziram significativamente essa atividade (Figura 11B).

Nos testes de campo aberto, e sob os mesmos regimes de inoculação (IUS, Figura 11C e ICAH Figura 11D) camundongos provenientes do AE e do AP apresentaram um aumento significativo no tempo de imobilidade na 7ª SPI. De fato os grupos infectados sob o regime IUS do AE aumentaram o tempo de imobilidade em comparação à pré-inoculação em 57% e os do AP em 28% e aqueles sob o regime ICAH do AE aumentaram o tempo de imobilidade em 45% e os do AP em 25,35% (ANOVA um critério, teste Bonferroni *a priori*, $p < 0,05$). Nenhum dos grupos controles mostrou alterações significativas.

5.3. Sinais clínicos e sobrevivência

Comparado aos animais do regime ICAH, os camundongos que receberam múltiplas infecções com um único sorotipo (IUS) não só sobreviveram períodos mais longos, mas exibiram sinais clínicos muito menos intensos. Sob o regime ICAH, os animais do AE mostraram sinais clínicos mais cedo e mais intensos, incluindo: dispneia, tremores, postura encurvada, pelo eriçado, imobilidade, paralisia pré-terminal, choque e eventual morte, sintomas esses não observados nos camundongos do AP. A análise de Kaplan-Meier revelou diferenças significativas nas curvas de sobrevivência dos grupos experimentais sob o regime ICAH (controle, AE e AP, log-rank test, $p = 0,0025$).

Sob o regime IUS, embora os camundongos do AE tenham apresentado taxas mais elevadas de mortalidade e sintomas da doença (40%) em comparação com o AP (23,1%) a análise de Kaplan-Meier não mostrou diferenças significativas entre as curvas de sobrevivência do controle e dos animais infectados (Kaplan-Meier, log-rank test $p = 0,089$). Entretanto o regime de inoculações ICAH mostrou diferenças significativas na análise de Kaplan-

Meyer (controle, AE e AP, log-rank test, $p = 0,0025$); Figura 11B. Nenhum dos animais controle injetados com homogeneizado de cérebro não infectado mostrou quaisquer alterações significativas na probabilidade de sobrevivência.

Com o intuito de reduzir o número de mortes e diminuir a intensidade dos sintomas clínicos sob o regime de múltiplas infecções acentuadas por anticorpo heterólogo, injetamos nesse grupo uma única dose de glicocorticoides aos 38 DPI (Figura 12C). Nos grupos experimentais AE e AP, os animais sob o regime ICAH injetados com glicocorticoides mostraram um aumento na probabilidade de sobrevivência (log-rank test, $p = 0,016$), apesar dos esforços contínuos para induzir a doença, mantendo as inoculações durante o período. De fato mesmo mantendo o regime de ICAH, após uma única dose de glicocorticoides, os sinais clínicos e as mortes foram reduzidas e a curva de probabilidade de sobrevivência estabilizou-se 4-6 semanas nos grupos experimentais AE e AP. Cessado o efeito esperado, 50 dias após a inoculação de glicocorticoides estabeleceu o declínio na curva de sobrevivência.

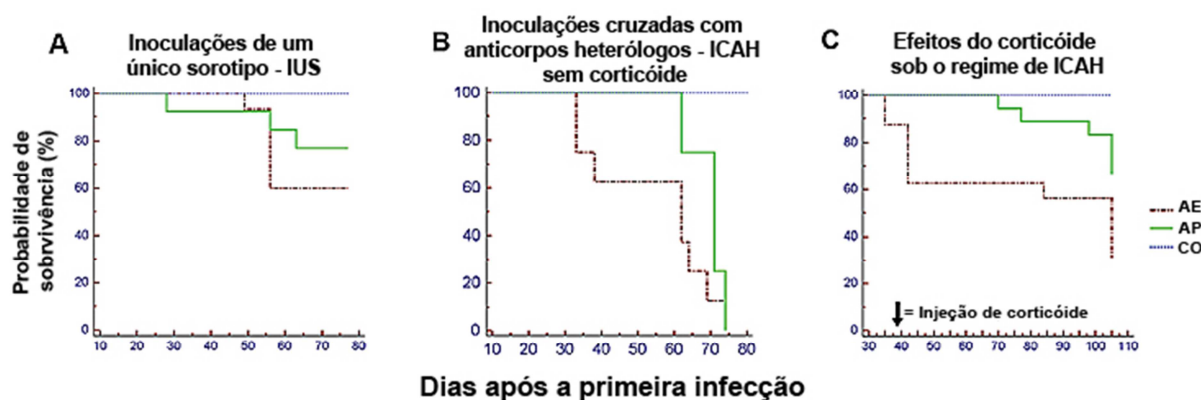


Figura 12. Evolução da probabilidade de sobrevivência em função do tempo sob os regimes de múltiplas inoculações de um único sorotipo - IUS (A) ou sob o regime de múltiplas inoculações de um único sorotipo alternadas com anticorpo heterólogo - ICAH (B, C). Note que quando comparado ao regime ICAH os animais infectados sob o regime IUS sobreviveram por períodos mais longos sem sinais de doença e isso está refletido na análise de Kaplan-Meier desse grupo (log rank test, $p = 0,27$). Como esperado os animais controle não mostraram nenhuma mudança na curva de probabilidade de sobrevivência. A probabilidade de sobrevivência após o regime de infecção ICAH (B) decresceu mais rapidamente de forma significativa (log rank test, $p = 0,0025$). Sob esse regime há um declínio mais rápido da curva de probabilidade dos sujeitos do ambiente enriquecido (AE) quando comparado aos sujeitos do ambiente empobrecido (AP). Para reduzir a taxa de mortalidade e diminuir a intensidade dos sintomas clínicos aplicou-se uma única dose de glicocorticoides no momento indicado pela seta (C). Após a aplicação desenvolveu-se um platô na curva de sobrevivência dos grupos experimentais que receberam corticoides sugerindo que a redução dos sintomas clínicos e das mortes durante o platô pode estar associado a um efeito anti-inflamatório (Kaplan-Meier, log-rank test, $p = 0,016$). Nenhuma diferença significativa foi observada nos indivíduos inoculados

com homogeneizado cerebral não infectado (NI). Linha tracejada azul = grupo não infectado; linha contínua verde = grupo infectado do ambiente empobrecido; linha tracejada vermelha = grupo infectado do ambiente enriquecido.

5.4. A influência da idade e do ambiente sobre o curso temporal da infecção por dengue acentuada por anticorpo heterólogo.

Uma vez estabelecido o modelo de infecção por dengue acentuada por anticorpo heterólogo em fêmeas adultas de camundongos da variedade albina suíça no experimento 01, analisamos o impacto do envelhecimento e do ambiente sobre o curso temporal da infecção comparando animais de 9 (experimento 01) e 18 meses de idade (experimento 02). Para facilitar a visualização gráfica dos resultados da análise comparativa com os animais velhos reproduzimos na Figura 13 parte dos achados relacionados às curvas de sobrevivência dos animais jovens sob o regime de infecções múltiplas acentuadas por anticorpo heterólogo previamente apresentado.

5.5. Sinais clínicos e sobrevivência.

A Figura 13 reúne dados de animais jovens e velhos submetidos ao regime de infecções múltiplas de um único sorotipo alternadas com inoculações de anticorpo heterólogo (ICAH) previamente descrito. Também compara os efeitos de uma única injeção de glicocorticoides sobre a curva de probabilidade de sobrevivência dos animais idosos em relação aos jovens.

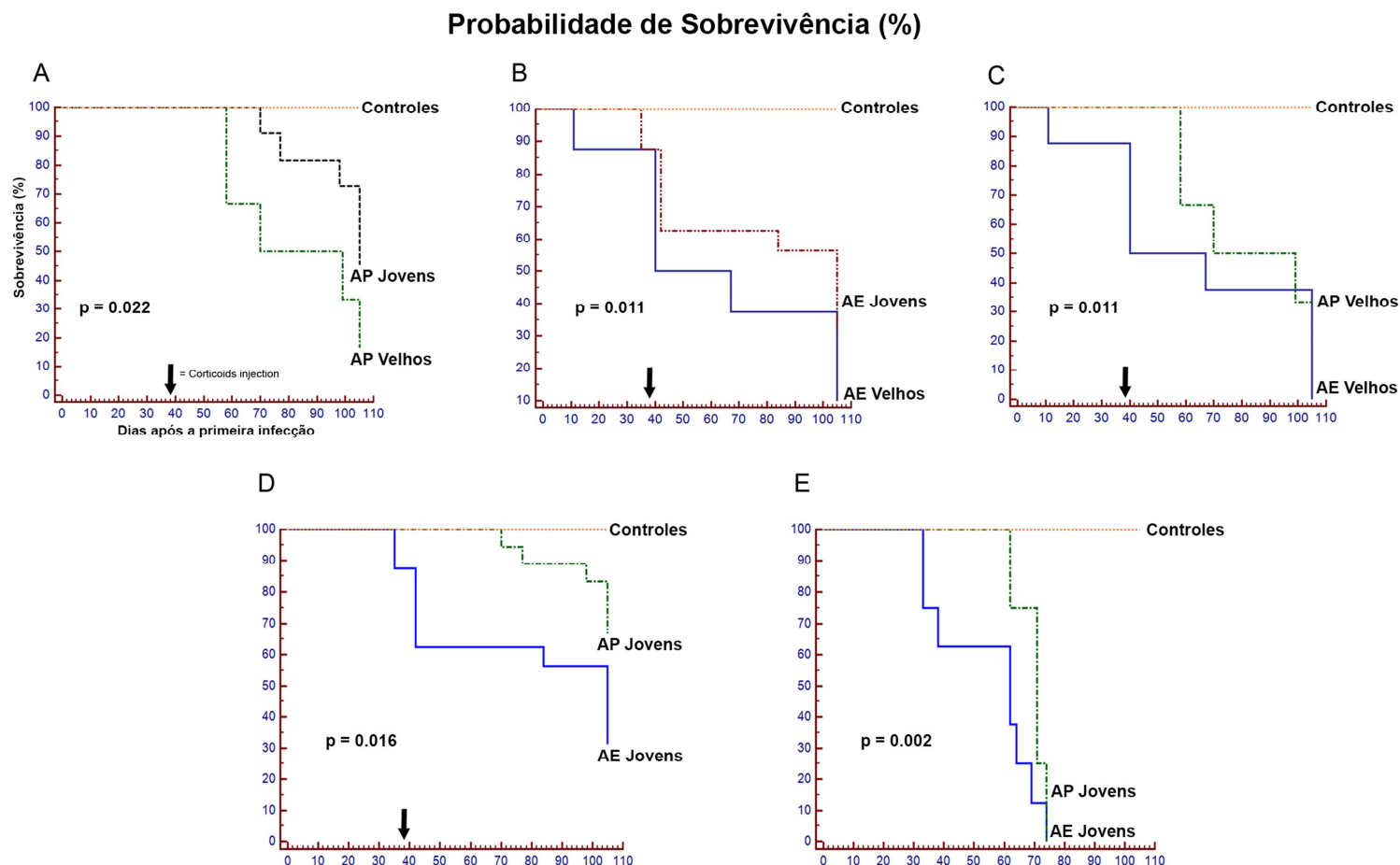


Figura 13. Curvas de sobrevivência sob o regime de múltiplas infecções por um único sorotipo acentuada por anticorpo heterólogo em fêmeas adultas de camundongos suíços albinos. As linhas pontilhadas vermelhas correspondem a probabilidade de sobrevivência do grupo controle em função do tempo expresso em dias após a primeira inoculação. As linhas tracejadas verdes correspondem aos animais infectados provenientes do ambiente empobrecido: animais velhos (A - C) e jovens (D, E). As linhas contínuas azuis correspondem aos animais infectados do ambiente enriquecido: velhos (B, C) e jovens (D, E). A todos os animais do ambiente empobrecido (Velhos, $n=8$; Jovens, $n=18$) e enriquecido (Velhos, $n=8$; Jovens, $n=16$) foram administrados por via intraperitoneal volumes iguais de homogeneizado cerebral infectado com VDEN3 (genótipo III) seguido de soro hiperimune anti-VDEN2 24h mais tarde. As setas indicam o momento da administração de uma única dose de glicocorticoides com o intuito de reduzir a mortalidade. Notar o menor impacto dos glicocorticoides nos animais velhos em comparação aos animais jovens (A, B) e a queda mais rápida da probabilidade de sobrevivência dos animais que não receberam corticoides (E). As curvas expressando a probabilidade de sobrevivência dos animais velhos independente do ambiente revelaram queda mais precoce do que a dos animais jovens (A-B). A comparação entre animais velhos de diferentes ambientes revelou menor taxa de sobrevivência nos animais do ambiente enriquecido em comparação aos do empobrecido (C).

Após as infecções em série sob o regime de ICAH, animais jovens e velhos do AE apresentaram sinais clínicos comparáveis e de maior intensidade do que os apresentados pelos animais do AP de mesma idade.

A Figura 13 ilustra a evolução da probabilidade de sobrevivência empregando a análise de Kaplan-Meier, indicando diferenças significativas nas comparações entre os grupos experimentais (A: AP velhos vs AP jovens, log-rank, $p = 0,022$; B: AE velhos vs AE jovens, teste log-rank, $p = 0,011$; C: AE velhos vs AP velhos, teste log-rank, $p = 0,011$; D: AE jovens vs AP jovens, teste log-rank, $p = 0,016$) apontando ainda o percentual de mortes (100% de mortes no AE velhos, 75% no AP velhos, 44% no AE jovens e 17% no AP jovens). Notar que 100% dos animais que não receberam glicocorticoides (AE jovens e AP jovens) morreram ou reduziram em 60% sua atividade de estocagem de ração, mais cedo do que todos os outros grupos que receberam corticoides (E). É de interesse realçar que no grupo de animais que não recebeu corticoides as mortes nos camundongos jovens do AE começaram mais cedo do que no AP (teste log-rank, $p = 0,0025$, figura E) e que todos os animais do grupo não infectado sobreviveram.

Em comparação com os animais jovens a injeção de glicocorticoides no momento indicado pelas setas na Figura 13 não teve efeitos significativos em camundongos velhos, independente do ambiente. Por conta do fato de que os efeitos da infecção foram mais precoces nos animais jovens do AE do que nos jovens do AP e a injeção dos glicocorticoides foi feita em sincronia com esse momento, os efeitos aparentes dos glicocorticoides estabilizando a curva de sobrevivência foram mais precoces e mais intensos no AE do que nos animais do AP (Figura 13 D e E).

5.6. Atividade de Burrowing.

Animais sob o regime de infecção ICAH, AE velhos e AE jovens mostraram diminuição similar significativa na estocagem de ração na 7ª SPI (AE velhos pré-inoculação = $100 \pm 10,26$ vs AE velhos 7ª SPI = $48,07 \pm 8,66\%$, $p = 0,014$; AE jovens pré-inoculação = $100\% \pm 2,75$ vs. AE jovens 7ª SPI = $38,07 \pm 9,46$, $p = 0,001$), com reduções de 51.93% e 61.93%, respectivamente (ANOVA 1 critério, Bonferroni *a priori* teste, $p < 0,05$) enquanto que os animais velhos do AP (pré-inoculação = $80,64 \pm 7,16\%$ vs AP velhos 9ª SPI = $48,41 \pm 10,2\%$, $p = 0,05$) mostraram menor redução na ração removida (32,32%); animais AP jovens não alteraram a atividade de estocagem ($p > 0,05$).

Tomados em conjunto, esses resultados indicam que o envelhecimento e o ambiente enriquecido estão associados aos sintomas clínicos mais intensos e à progressão mais rápida da doença induzida pelo regime de infecções ICAH em modelo murino imunocompetente.

5.7. Alterações histopatológicas.

A Figura 14 reúne fotomicrografias de secções representativas do fígado e pulmões imunomarcadas para a proteína NS1 do VDEN, provenientes de camundongos velhos e jovens mantidos em ambientes enriquecido e empobrecido. A análise sistemática de sua distribuição nos diferentes grupos revelou que os animais AE tem maior grau de imunomarcção para o antígeno viral do que os animais do grupo AP e que as secções dos animais velhos dos animais AP apresentaram o menor grau de imunomarcção dentre todos os grupos experimentais. Nenhuma imunomarcção para a proteína NS1 foi detectada nas secções dos grupos controle.

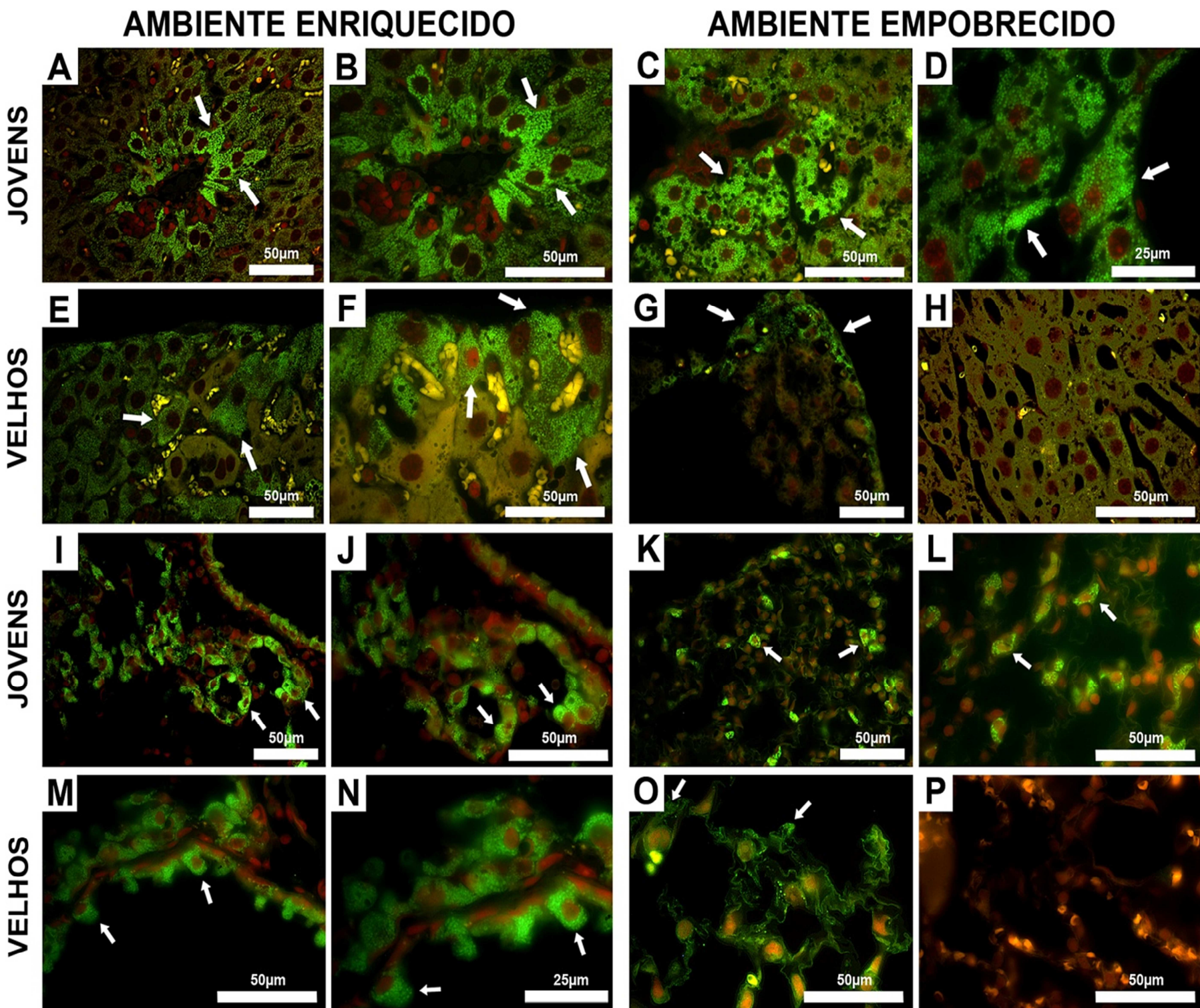


Figura 14. Imunomarcção para glicoproteína NS1 do VDEN3 (genótipo III) no fígado (A-G) e pulmão (I-O); nas linhas 2 e 4 ilustram-se fotomicrografias de secções dos animais velhos e nas linhas 1 e 3 dos animais novos. Nas colunas 1 e 2 fotomicrografias de secções obtidas de camundongos criados em ambiente enriquecido e nas colunas 3 e 4 em ambiente padrão. Jovens e velhos do ambiente enriquecido mostraram um maior grau de imunomarcção do antígeno viral do que os animais do ambiente padrão pareados por idade. O fígado e o pulmão do animal controle (H e P) não apresentaram imunomarcção para o antígeno viral. As setas indicam exemplos de células imunomarcadas.

A Figura 15 reúne fotomicrografias de secções de baço e rins imunomarcadas para a proteína NS1 do VDEN. A imunofluorescência para esse antígeno viral é limitada ao citoplasma e aparece na fotomicrografia como um anel fluorescente verde em torno dos núcleos das células mononucleares. A imunofluorescência revelando a presença do antígeno viral pareceu ocorrer com maior frequência nas células do tecido intersticial renal e na região glomerular (células semelhantes às endoteliais) do que nas epiteliais dos túbulos renais.

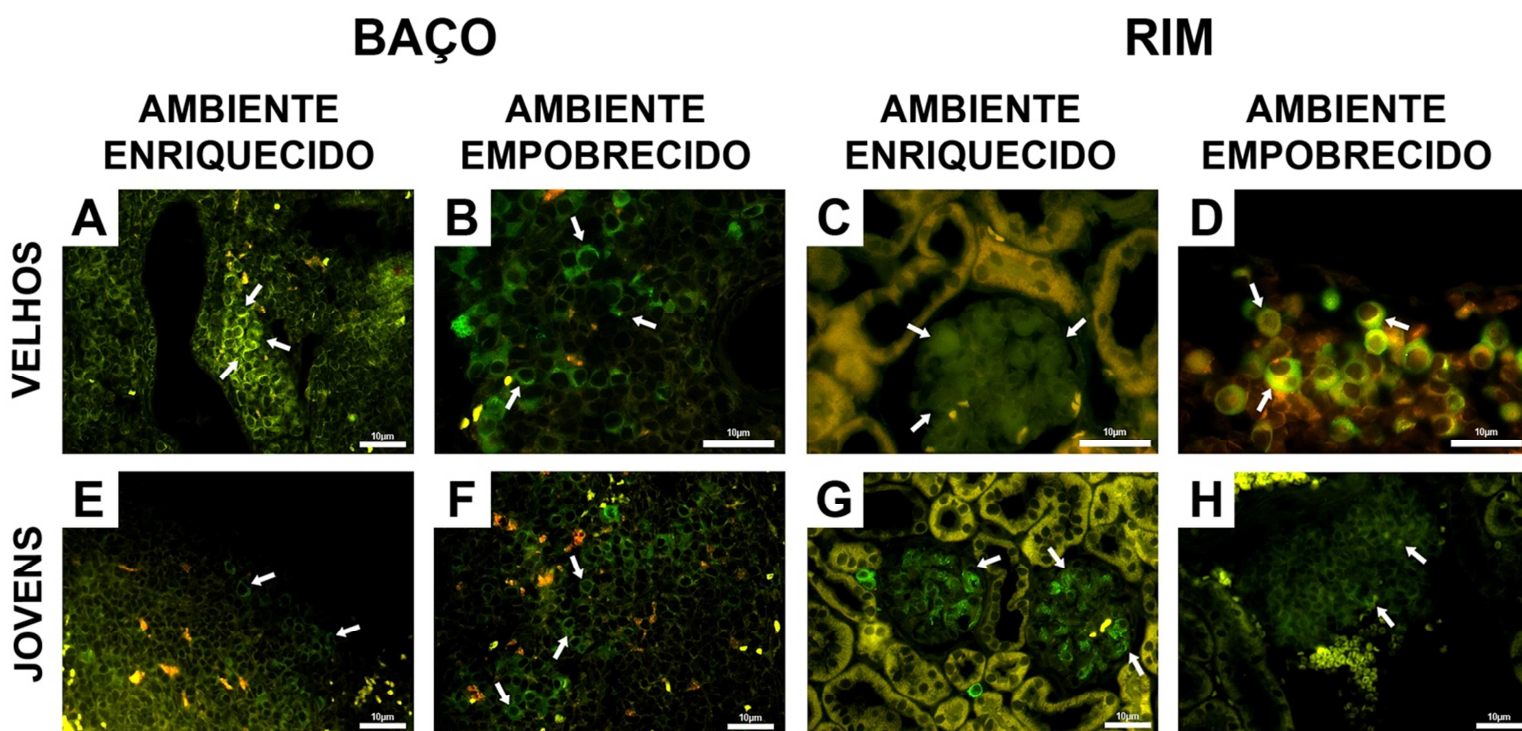


Figura 15. Fotomicrografias de células imunomarcadas para a glicoproteína NS1 de VDEN3 genótipo III obtidas de secções reagidas por imunofluorescência. Baço (A, B, E e F) e rim (C, D, G e H); secções obtidas de animais velhos (fileira superior) e jovens (fileira inferior) que cresceram em ambientes empobrecido ou enriquecido. A imunomarcagem para NS1 de VDEN 3 (setas) é restrita ao citoplasma e aparece como um anel em torno do núcleo da célula mononuclear. Notar que o núcleo arredondado de células mononucleares, tanto no baço (A, B, E e F) quanto nos rins (D e H) não são imunomarcadas para a proteínas viral. Antígenos virais aparecem ser menos frequentes nas células epiteliais tubulares do que nas células endoteliais na região glomerular (C e G), entretanto, são mais frequentes nas células inflamatórias do tecido intersticial renal (D e H).

A Figura 16 ilustra alterações histopatológicas associadas à dengue acentuada por anticorpo heterólogo em regime de múltiplas infecções. As fotomicrografias de secções representativas do pulmão e fígado de animais infectados, coradas por hematoxilina-eosina foram selecionadas de modo a

realçar as principais mudanças histopatológicas em comparação com animais controle do grupo não infectado. A comparação sistemática dos achados nos animais AE e AP submetidos ao regime ICAH mostrou maior grau de infiltrados inflamatórios mononucleares nos primeiros do que nos últimos, tal como ilustrado nos pulmões e no fígado na Figura 16. Os infiltrados mononucleares inflamatórios dos animais velhos do ambiente enriquecido quando comparados com todos os outros grupos foram de longe, os de maiores dimensões. Nenhum infiltrado foi detectado nos animais dos grupos controle.

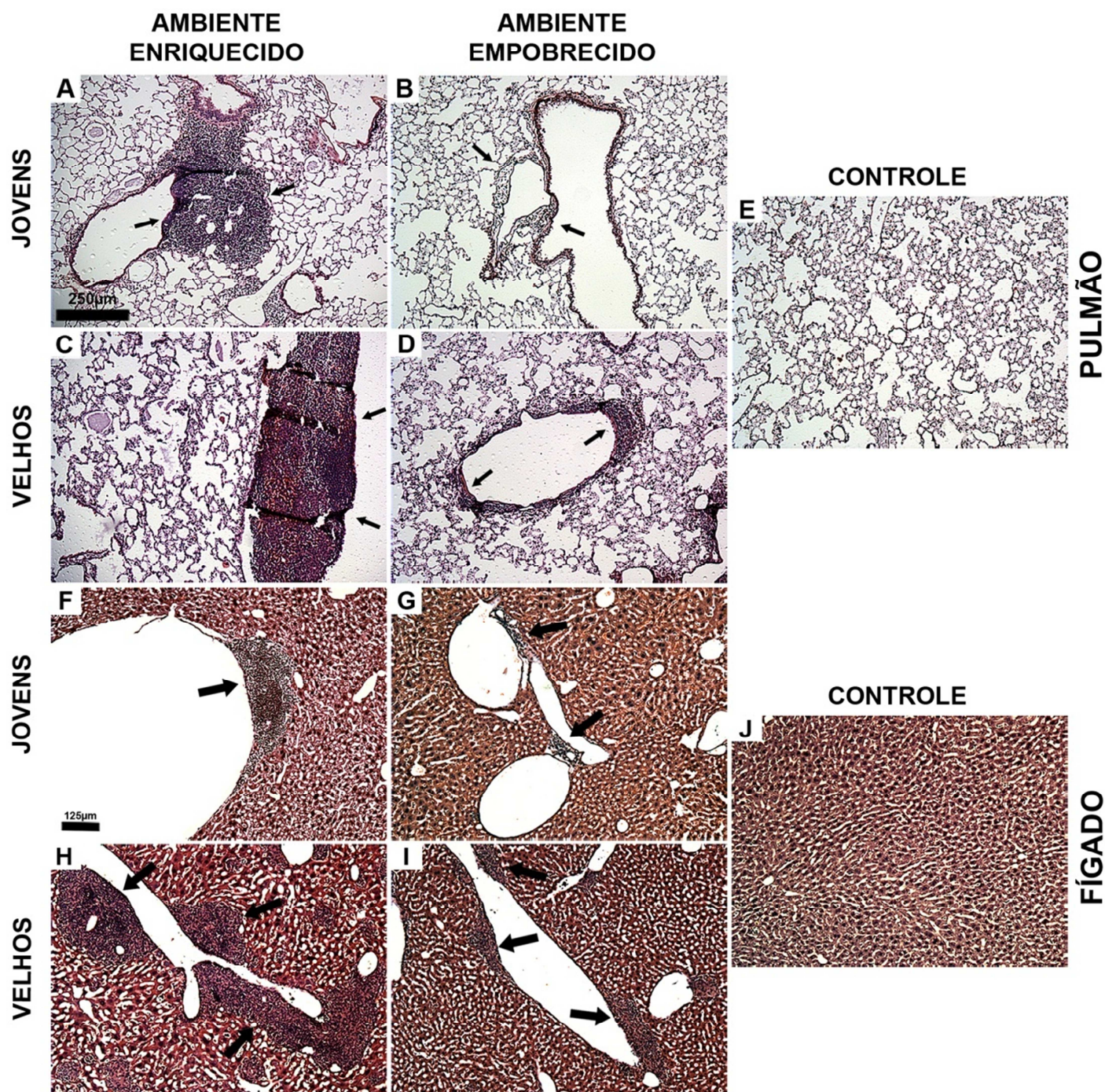


Figura 16. Fotomicrografias de secções coradas por hematoxilina-eosina para ilustrar as alterações histopatológicas no pulmão (A-E) e fígado (F-J) após infecção por VDEN3 acentuada por anticorpo heterólogo. Secções obtidas de pulmões de camundongos infectados jovens (A e B), velhos (C e D) e do animal controle (E). Notar infiltrados de células mononucleares (setas) de dimensões maiores em animais alojados no ambiente enriquecido do que no empobrecido. Pulmões de camundongos velhos continham infiltrados maiores do que os animais jovens de ambientes correspondentes. As secções do fígado mostram infiltrados mononucleares inflamatórios no espaço subendotelial das veias peri-eferentes maiores no grupo jovem (F) e velho (H) do ambiente enriquecido em comparação com os animais do ambiente empobrecido. Camundongos velhos do ambiente enriquecido (H), quando comparados com todos os outros grupos tiveram de longe uma maior infiltração mononuclear. Não detectou infiltração mononuclear nos animais controles não infectados (J). Barra de escala (A-E) 250µm e (F-J) 125µm.

A Figura 17 ilustra as principais alterações patológicas nos rins e baço de animais infectados em regime de ICAH em comparação ao controle. Independente da idade ou ambiente a presença de infiltrados mononucleares, foi, tal como no fígado e pulmões, o principal achado nas secções obtidas dos rins dos animais infectados. Similarmente a polpa branca do baço apresentou hiperplasia linfóide independente da idade e do ambiente.

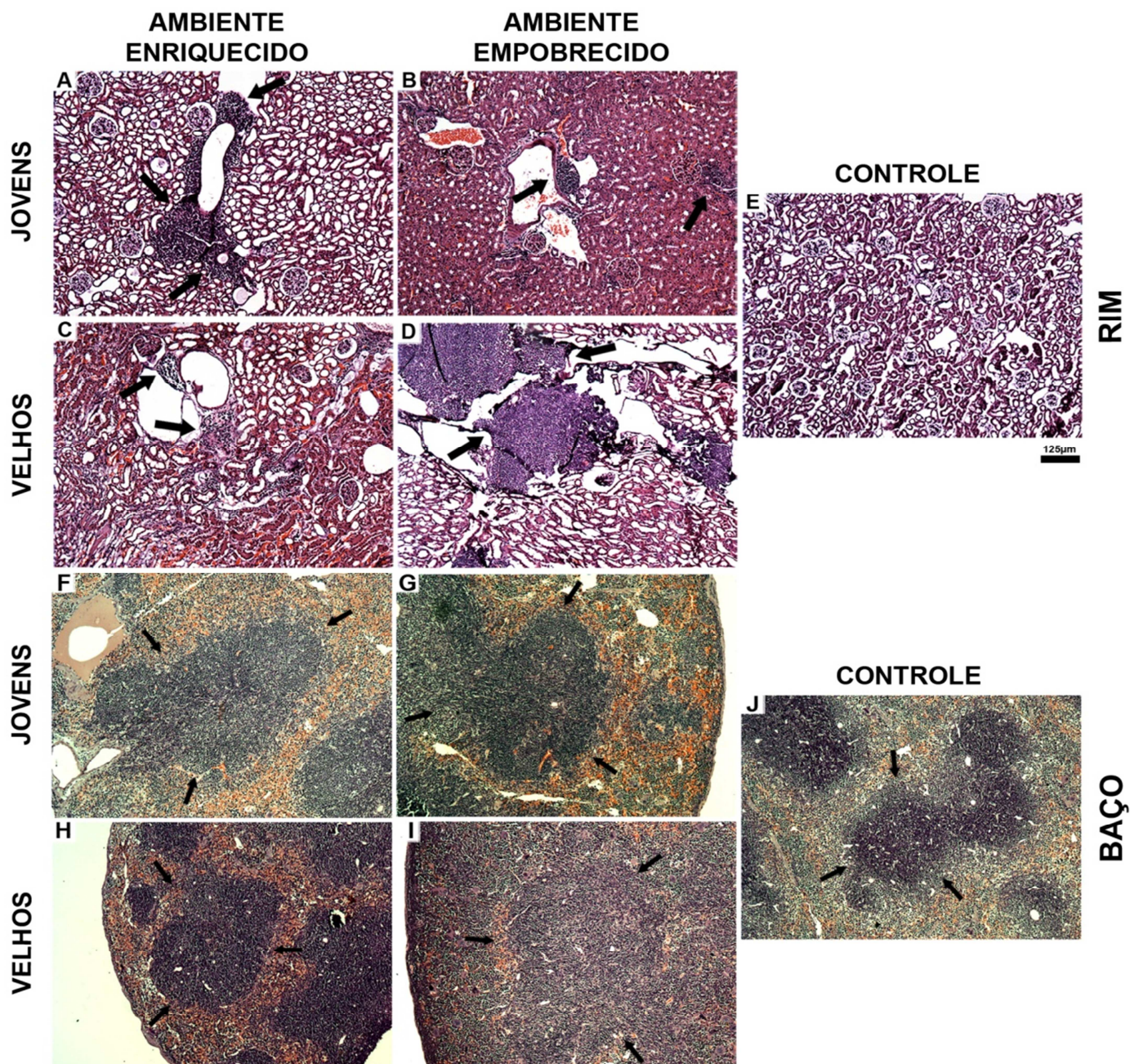


Figura 17. Fotomicrografias de secções de rim (A-E) e baço (F-J), após a infecção com VDENV3 acentuada por anticorpo heterólogo, coradas por hematoxilina/eosina. Notar a presença de infiltrados mononucleares nos rins de animais infectados jovens (A e B), velhos (C e D) e a ausência deles no grupo controle (E). Hiperplasias mononucleares na polpa branca do baço de

animais infectados (F e G) e de animais velhos (H e I), em comparação com o controle (J). Não foram encontradas correlações diretas entre a idade ou ambiente com o grau de infiltração mononuclear nos rins, ou com o grau de hiperplasia mononuclear no baço, mas todas as amostras de tecidos dos camundongos infectados mostraram infiltração e hiperplasia mononuclear respectivamente nos rins e baço. As setas apontam para infiltrados nos rins e hiperplasia mononuclear no baço de camundongos infectados. Escala 125µm.

A Figura 18 ilustra resultados de imuno-histoquímica para detecção de linfócitos T em animais velhos que cresceram em diferentes ambientes. Comparado ao grupo AP pareado por idade, nos camundongos velhos do grupo AE foram encontrados os maiores infiltrados dominados por linfócitos T imunomarcados para CD3, tanto no fígado, próximo a periveia eferente, quanto nos pulmões próximo aos espaços peribrônquicos. A Figura 18 também ilustra linfócitos T (imunomarcados para CD3, CD4 e CD8) e B (imunomarcados para CD20) no baço e nos rins dos camundongos velhos infectados. Esses achados foram virtualmente ausentes no grupo controle.

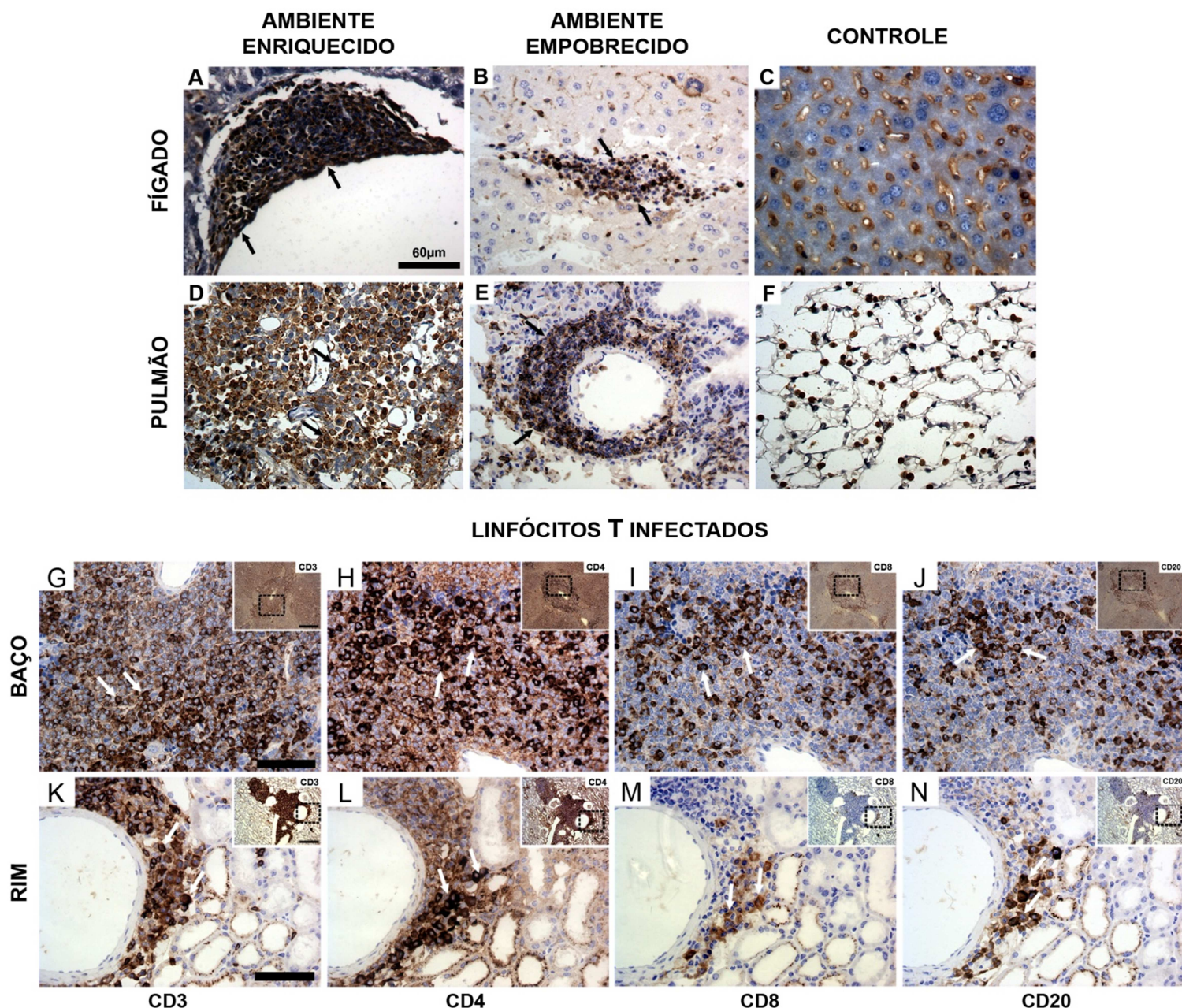


Figura 18. Fotomicrografias de linfócitos T a partir de infiltrados no fígado, pulmão e rim e de hiperplasias da polpa branca do baço de camundongos velhos infectados. (A–F) imuno-histoquímica para linfócitos T ($CD3^+$), e hematoxilina de Harry's em contra- coloração para ilustrar em fígado (A, B) e pulmão (D, E) infiltrados de linfócitos T em secções provenientes de animais mantidos em ambiente enriquecido (A, D), empobrecido (B, E) e a ausência deles nos animais controles (C e F). Animais velhos do ambiente enriquecido tendem a mostrar maior grau de imunomarcção. Imuno-histoquímica para CD3 (G e K), CD4 (H e L), CD8 (I e M) e CD20 (J e N) contrastadas com hematoxilina de Harry's. As setas apontam para células imunomarcadas. Escala do painel superior: 60 μ m. Inserção em pequeno aumento no painel inferior (G-N): 125 μ m; (K-N): 60 μ m.

A presença do vírus 24h após a última inoculação de homogeneizado cerebral infectado por VDEN3 quando os sinais clínicos tornaram-se aparentes foi indiretamente quantificado por PCR em tempo real (RT-PCR) usando

primers específicos para o gene E do VDENV3. O PCR foi realizado empregando o SuperScript III Platinum SYBR Green One-step qRT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Títulos virais baixos foram detectados nessa janela temporal, mas o maior número de cópias do genoma viral foi encontrado no fígado dos animais do ambiente enriquecido (10.9 cópias/ml) seguido do baço (0.29 cópias/ml), pulmões (0,02 cópias/ml) e cérebro (0,002 cópias/ml).

Apesar da carga viral tecidual baixa nessa janela temporal e das nossas amostras reduzidas em número, a análise quantitativa por RT-PCR mostrou que os animais quantificados tiveram nas amostras de fígado o maior número de cópias do genoma viral.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho testamos as influências do envelhecimento e do ambiente enriquecido na progressão da doença causada pelo vírus da dengue acentuada por anticorpo heterólogo, em modelo murino imunocompetente, o camundongo suíço albino. Para isso testamos dois regimes de infecções múltiplas, empregando um único sorotipo. No primeiro, empregamos uma série de inoculações de homogeneizado cerebral infectado com VDEN3 genótipo III e no outro alternamos inoculações de homogeneizado cerebral infectado com o mesmo sorotipo com inoculações de soro hiperimune, contendo anticorpos anti-VDEN2. Embora não tenhamos encontrado diferenças significativas entre os grupos experimentais sob o regime de infecções múltiplas por um único sorotipo, sob o regime de infecções múltiplas acentuadas por anticorpo heterólogo, tanto os animais jovens quanto os velhos do ambiente enriquecido mostraram sintomas clínicos mais intensos e número de mortes mais elevado do que os animais do ambiente padrão. Além disso, demonstramos que esses sinais de infecção nos animais do ambiente enriquecido estão associados a um maior grau de imunomarcagem para a proteína NS1 do VDEN, a maior infiltração de linfócitos T no fígado, pulmões e rins e hiperplasia na polpa branca do baço dominada por linfócitos T.

6.1. Regime de infecção, sinais de doença e resposta inflamatória exacerbada.

Nossos resultados relacionados ao regime de infecção múltipla por um único sorotipo podem sugerir que tanto a resposta imune inata à infecção primária por VDEN quanto a resposta adaptativa às infecções subsequentes conferiram proteção contra a doença. Realmente nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos experimentais sob esse regime de infecção no presente trabalho. A proteção encontrada contra a infecção é consistente com resultados prévios que apontam que a resistência à infecção por dengue após uma infecção primária é decorrente da ação antiviral de linfócitos efetores que promovem a remoção (*clearance*) viral (Ip e Liao, 2010). De fato a atividade antiviral que promove o *clearance* em camundongos é

dependente de células T produtoras de TNF α e INF γ e é dirigida de forma seletiva ao epítipo H-2Db (Friberg, Bashyam, *et al.*, 2011; Friberg, Burns, *et al.*, 2011).

Entretanto sob o regime de infecções múltiplas acentuadas por anticorpo heterólogo um número significativo de mortes foi detectado e em maior proporção nos animais do ambiente enriquecido. Sob esse regime, entre 28 e 56 dias pós-infecção, sintomas clínicos severos se instalaram com intensa dispneia que eventualmente evoluíram para a paralisia pré-terminal e morte. Esse intervalo entre a primeira infecção e os sintomas é compatível com o tempo necessário para formação da resposta imune inata em modelos murinos de infecção sequencial, empregando sorotipos diferentes (Beaumier *et al.*, 2008; Kyle *et al.*, 2008; Beaumier e Rothman, 2009; Zompi *et al.*, 2012).

Consistente com uma hipótese inflamatória para o agravamento da doença nesses animais encontramos no presente trabalho, importante coexistência entre imunomarcagem para a proteína viral NS1 e a infiltração linfoide dominada por linfócitos T em torno da periveia eferente hepática, no espaço peribrônquico e no interstício renal e hiperplasia linfoide na polpa branca do baço dos animais infectados. Esses resultados de imunomarcagem e mobilização de linfócitos T foi maior nos animais do ambiente enriquecido do que nos do ambiente padrão pareados por idade.

Esses achados, sugerindo a exacerbação da resposta inflamatória, são compatíveis com sugestões anteriores de que qualquer que seja o regime de infecção que conduziu a dengue severa, uma resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro contribui para a sua patogênese (Basu e Chaturvedi, 2008; Rothman, 2011; Gil *et al.*, 2012; Da Conceição *et al.*, 2013). Ver recente revisão reunindo elementos que dão consistência a hipótese da inflamação exacerbada como elemento determinante para as formas graves de dengue (Costa *et al.*, 2013). O TNF derivado de monócitos infectados e de células T ativadas, é o principal mediador responsável pela alteração das células endoteliais que leva ao extravasamento de plasma (Halstead, 2007). Além disso, a infecção por VDENV detectada pelos mastócitos também contribui para a ativação da célula endotelial (Brown *et al.*, 2011) e para a liberação de fator de crescimento endotelial vascular e de proteases durante o choque sindrômico da dengue (Furuta *et al.*, 2012). Além disso, foi encontrado número de

mastócitos aumentado no espaço peribrônquico e nas áreas adjacentes ao septo interalveolar e pneumonia intersticial em camundongos experimentalmente infectados com VDEN, compatível com os sintomas respiratórios graves encontrados no presente trabalho (Barreto *et al.*, 2007).

Alinhado com a hipótese de uma resposta inflamatória exacerbada encontramos igualmente no presente trabalho uma redução do número de óbitos e dos sintomas clínicos após a administração de uma única injeção tardia de glicocorticoides nos animais jovens, sugerindo que um efeito anti-inflamatório pode ter sido responsável pela diminuição da severidade da doença. Em linha com esse resultado, o número de óbitos no grupo de animais que não recebeu corticoides foi muito maior e uma vez cessado o efeito dos glicocorticoides o número de óbitos e os sintomas clínicos da doença nos animais tratados voltou a subir. Por conta do fato de que os glicocorticoides reduzem a proliferação de linfócitos T (Lu *et al.*, 2010) e inibem completamente a produção de citocinas (Teeling *et al.*, 2010), nós sugerimos que durante esse período de remissão dos sintomas e da mortalidade o processo inflamatório diminuiu. Evidência suplementar é o fato de que a ação benéfica dos glicocorticoides ocorre em estágio tardio, mas não nos estágios iniciais de doenças virais com forte componente inflamatório (Sergeie *et al.*, 2007) e que isso é igualmente válido para infecção humana por VDEN em sua forma grave (Premaratna *et al.*, 2012).

Os glicocorticoides atuam nas células T através de seus receptores intracelulares e podem regular negativamente a expressão de numerosos genes associados a sinalização pró-inflamatória de citocinas pró-inflamatórias (Van Laethem *et al.*, 2001). Apesar de não termos explicação para a redução dos efeitos dos glicocorticoides nos camundongos infectados velhos, foi descrita uma redução dos receptores de glicocorticoides de baixa afinidade em ratos idosos (Lee *et al.*, 2012) o que pode contribuir para redução dos efeitos anti-inflamatórios. Mas por conta do fato de que não medimos a densidade de receptores de glicocorticoides no presente trabalho e não conhecemos a distribuição sistêmica de tais receptores nos animais infectados velhos, esta questão ainda permanece por ser investigada.

6.2. Ambiente enriquecido, Envelhecimento e dengue.

Outro aspecto a ser considerado é o de que os animais infectados velhos do ambiente enriquecido em comparação aos jovens mostraram maior mortalidade sob o regime de infecções acentuadas por anticorpo heterólogo. Esse achado é coerente com resultados prévios em camundongos velhos submetidos à infecção viral secundária (Jiang *et al.*, 2009; Decman *et al.*, 2010) tanto quanto em humanos idosos (Castle, 2000). De fato tem sido sugerido que a resposta antiviral em idosos é comprometida por potencial proliferativo reduzido de células T imunodisponíveis assim como a diferenciação alterada de células T CD8+ (Brien *et al.*, 2009; Brunner *et al.*, 2011; Jiang, Fisher e Murasko, 2013). Da mesma forma, a imunidade inata é também comprometida durante o envelhecimento e um exemplo disso é a diminuição da proliferação e natural citotoxicidade de células NK que está diminuída no envelhecimento (Gayoso *et al.*, 2011). As figuras 19 e 20 ilustram em função da idade a curva temporal da suscetibilidade a patógenos e a redução da imunodisponibilidade durante o envelhecimento. Como se depreende da Figura 19 os valores mais altos de suscetibilidade ocorrem durante os primeiros anos de vida e a partir dos 65 anos de idade e esses valores guardam uma relação inversa com o número total das células T de memória no início da vida mas uma correlação direta no final da vida (Farber, Yudanin e Restifo, 2014) quando as células T imunodisponíveis diminuem, com redução da diversidade e do número total de clones (Figura 20) (Goronzy e Weyand, 2013).

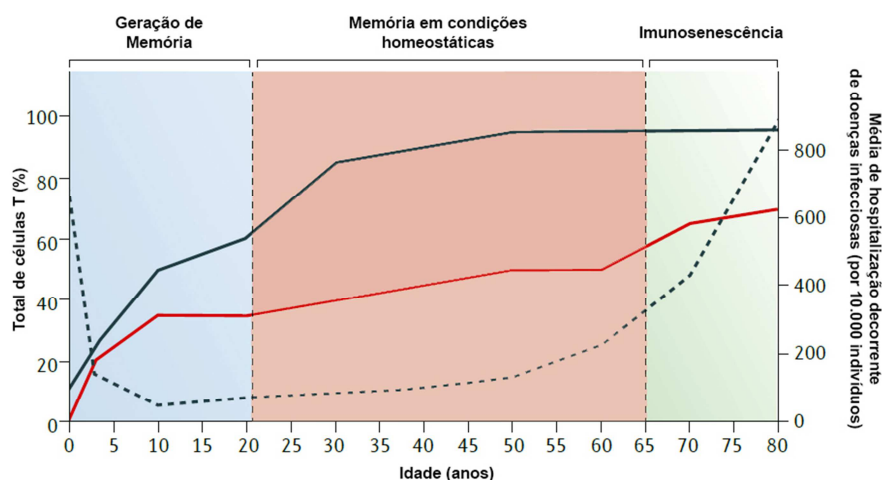


Figura 19. Frequência de células T de memória, suscetibilidade e taxa de hospitalização. As células T de memória passam por três fases distintas: geração de memória, período de homeostase e período de imunosenescência. As células T de memória são geradas em sua

maioria durante a infância, adolescência e vida adulta cobrindo a faixa etária de 0 a 20 anos. Seus níveis subsequentemente se alteram lentamente e depois atingem um plateau entre as idades de 30 a 65 anos quando atingem finalmente o período senescente (65 anos em diante). Notar que o número de células T circulantes no sangue aumenta com a idade (linha vermelha). Nos tecidos como um todo que inclui o sangue, intestinos, pulmões, pele, fígado, cérebro e tecidos linfoides, a frequência de células T (linha preta) elas também aumentam em função da idade. O decréscimo na suscetibilidade indicada pela linha tracejada guarda uma relação inversa com o acréscimo de células T. Esse indicador foi estabelecido a partir taxa de hospitalizações por 10.000 habitantes no período de 1998 a 2006 nos Estados Unidos levando em consideração um total de 40 milhões de hospitalizações. Figura adaptada de (Farber, Yudanin e Restifo, 2014).

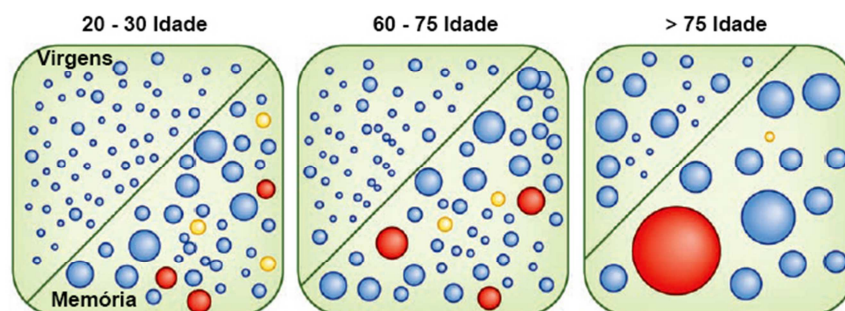


Figura 20. Repertório de células T CD4 positivas em função da idade. Notar que os compartimentos de células T imunodisponíveis e de células T de memória CD4 positivas muda com a idade. Ao final do período de crescimento (20 a 30 anos) um repertório diversificado de clones de células T de memória é encontrado em associação com um conjunto expressivo de células T imunodisponíveis (à esquerda). Independente da atividade do timo o compartimento de células imunodisponíveis exibe apenas um declínio moderado nas décadas subsequentes mantendo um equilíbrio com a diversidade de células T de memória (ao centro). Entretanto uma contração abrupta é observada acima dos 75 anos (à direita). As células T de memória à infecção latente por citomegalovírus e ao vírus da varicela (vírus Zoster) estabelecidas no compartimento de memória agem de forma muito diferente durante o envelhecimento. Apesar de que a frequência clonal e o tamanho dos clones para o vírus da varicela diminuem com a idade, (círculos amarelos), os clones de células T específicos para o citomegalovírus (círculos vermelhos) dominam o repertório de células T de memória na fase tardia do envelhecimento contribuindo para a contração da diversidade do compartimento de memória. Adaptada de (Goronzy e Weyand, 2013)

Em contraste, o exercício regular tal como o observado nos animais do ambiente enriquecido está associado a números menores de células T senescentes (Spielmann *et al.*, 2011), aumento da capacidade proliferativa de células T (De Araújo *et al.*, 2013), menores níveis de citocinas inflamatórias, aumento da atividade fagocítica de neutrófilos, maior atividade citolítica de células NK, indicando que o exercício habitual pode regular a resposta imune e retardar o início da imunossenescência (Simpson, 2011; Simpson *et al.*, 2012)

Por conta do fato de que tem sido sugerido que a infecção por dengue acentuada por anticorpo heterólogo em camundongo imunocompetente é associada com uma resposta inflamatória exacerbada com dispneia intensa, dano alveolar difuso, espessamento intersticial dramático com infiltrado

mononuclear e acúmulo abundante de secreção intra-alveolar, sinais de necrose hepática, microesteatose (Falconar e Martinez, 2011) e que os camundongos velhos do ambiente enriquecido mostraram dispneia intensa associada à secreção intra-alveolar abundante e infiltração linfocítica de células T no espaço peribrônquico em maior proporção do que os camundongos velhos do ambiente padrão, nós sugerimos que uma resposta inflamatória de maior proporção pode ter ocorrido nos animais do ambiente enriquecido. Ainda que os dados descritivos de imuno e histopatologia do presente trabalho revelando imunomarcação para a proteína NS1 do VDEN em diferentes órgãos, em correlação com a presença de infiltrados de células T (CD3 positivas), sejam coerentes com essa sugestão, os mecanismos moleculares para explicar a resposta inflamatória diferencial nos diferentes tecidos permanecem por serem investigados.

Finalmente por conta do fato de que não mensuramos mediadores inflamatórios, permanece por ser investigado se há ou não há uma produção aumentada de citocinas que possa explicar as diferenças na severidade da doença e na taxa de mortalidade mais elevada nos animais do ambiente enriquecido em comparação com os do ambiente padrão.

6.3. Modelos experimentais murinos imunocompetentes em dengue.

Camundongos BALB/c e C57BL6 imunocompetentes são normalmente resistentes à infecção por dengue, mas tem sido usados para investigar a patogenia da doença. Aumentando a carga viral do inóculo contendo VDEN-2 a variedade C57BL/6 após inoculação subcutânea de 3×10^9 PFU, mostra sinais de doença com hemorragia sistêmica e morte após 3 dias da infecção (Chen *et al.*, 2007). Esses camundongos apresentam trombocitopenia severa, alta viremia, produção de TNF- α , infiltração macrofágica, apoptose de células endoteliais, e dano hepático mimetizando muitos dos sinais clínicos da dengue em humanos. Por conta do fato de que a doença clínica em humanos é gerada a partir de inóculo com carga viral estimada em 3 a 4 unidades logarítmicas mais baixas do que a empregada nesse modelo murino e os sinais da doença humana quando perceptíveis ocorrem 10 a 15 dias depois da primeira infecção,

a adoção desse modelo para comparação com a progressão da doença humana tem limitações importantes (Guabiraba e Ryffel, 2013).

A infecção de camundongos da linhagem BALB/c com VDEN2 obtida de pacientes humanos com carga viral compatível com as doses humanas não revelou por sua vez sinais clínicos de doença embora tenha apresentado alterações hepáticas histopatológicas e enzimáticas compatíveis com as da doença (Paes *et al.*, 2005). Em contrapartida, a utilização da linhagem JHA1 de VDEN2 que naturalmente infecta, produz alguns dos sintomas clínicos da doença e mata camundongos BALB/c, exige a utilização da via intracraniana para estabelecer os sinais de meningoencefalite observados em forma grave da doença quando o VDEN exibe características neurotrópicas (Amorim *et al.*, 2012). Por outro lado, a adoção da via intraperitoneal empregando o VDEN4 em BALB/c somente afetou camundongos recém-nascidos produzindo encefalite, extravasamento de plasma e dano severo da barreira hematoencefálica limitando as observações a um sistema imune imaturo (Velandia-Romero, Acosta-Losada e Castellanos, 2012). Outros estudos em BALB/c e C57BL6 empregando VDEN adaptado para produzir doença em camundongo, aumentam a suscetibilidade e revelam sintomas clínicos, mas a relevância dessas observações para a infecção em modelos murinos imunocompetentes deve ser interpretada com cuidado por conta do genótipo e fenótipo viral possivelmente alterado em sucessivas passagens (Tuiskunen *et al.*, 2011).

No presente trabalho, desenvolvemos um modelo murino de infecções múltiplas empregando carga viral por inoculação (10^3 cópias/ml), compatível com o esperado durante a picada de um mosquito hematófago (10^2 - 10^5 cópias/ml) (Styer *et al.*, 2007). Como em zonas onde o mosquito é abundante, o número de picadas por indivíduo é muito maior, nossa escolha pelo modelo de infecções múltiplas parece mimetizar o que de fato acontece. A opção por manter igualmente um regime de inoculações múltiplas do anticorpo heterólogo parece ter sido adequado para permitir a formação de complexos vírus-anticorpo necessários ao disparo do processo que culminou com a resposta inflamatória exacerbada e os sintomas clínicos associados. De fato, a imunomarcação seletiva para a proteína viral NS1 em muitos órgãos e em células reconhecidas como alvos da infecção apontam nessa direção e

sugerem que houve replicação viral significativa. Da mesma forma, o quadro histopatológico representado por infiltrações mononucleares dominados por linfócitos T é compatível com o que se tem descrito na literatura, sugerindo que essa classe de células contribui de forma importante para a patogenia das formas severas de dengue.

Até o momento a maioria das observações relacionadas aos fatores contribuindo para as formas severas de dengue tem origem em estudos epidemiológicos e em análises *in vitro*. Como a grande maioria das questões relacionadas ao sistema imune são difíceis de replicar *in vitro*, muitas questões relacionadas à resposta imune adaptativa modulando a infecção acentuada por anticorpo heterólogo permanecem por ser investigadas. Com o desenvolvimento do modelo para estudar a infecção por VDEN descrito neste trabalho, podemos agora testar *in vivo*, em um animal de pequeno porte e imunocompetente, muitas das hipóteses nascidas dos estudos epidemiológicos e *in vitro*.

6.4. Considerações finais e perspectivas

- Por conta do fato de que os mediadores humorais da resposta inflamatória não foram dosados, é útil em ensaios posteriores avaliar a concentração de citocinas e quimiocinas plasmáticas e aminotransferases em correlação com o aparecimento dos sintomas clínicos.

- A avaliação das respostas imune inata humoral e celular ao longo do regime de múltiplas infecções acentuadas por anticorpo heterólogo, assim como a de fixação do complemento pode ser útil para investigar suas contribuições para a progressão da doença ao longo de diferentes janelas temporais.

- Como é usual encontrarmos morte celular por apoptose em infecções humanas, é importante investigarmos utilizando caspase 3 e ou TUNEL a intensidade desse achado histopatológico após o regime de infecção ter sido instalado e os sintomas se tornarem aparentes.

- Seria igualmente importante imunomarcas as células alvo da infecção viral incluindo os adipócitos e localizar a presença do vírus por microscopia eletrônica de transmissão nessas células.

- Medir o grau de extravasamento do plasma empregando azul de Evans pode ser importante para caracterizar a infecção em sua forma severa.

7. CONCLUSÕES

- Os ensaios comportamentais e histopatológicos do presente trabalho permitiram testar e validar novo modelo murino imunocompetente para estudos em dengue baseado em um regime de múltiplas infecções acentuadas por anticorpo heterólogo.

- A partir da comparação dos grupos de animais mantidos em ambiente enriquecido e ambiente padrão foi possível confirmar que a estimulação somatomotoras, visuo-espacial e cognitiva do ambiente enriquecido afeta o sistema imune, reproduzindo no caso da infecção por dengue uma resposta inflamatória mais intensa.

- A análise imuno-histoquímica com marcador seletivo para linfócitos T permitiu confirmar a participação dominante dessas células nos infiltrados em fígado, pulmão e rins e hiperplasia no baço, órgãos alvos frequentes da infecção por dengue.

- Os ensaios comparativos entre camundongos jovens e idosos permitiram concluir que o envelhecimento afeta a resposta imune na infecção por dengue, agravando os sintomas clínicos e aumentando o número de mortes.

- A utilização de glicocorticoides, diminuindo o número de mortes e reduzindo os sintomas da doença nos animais jovens, permitiu sugerir o componente inflamatório exacerbado na infecção por dengue e que a resposta anti-inflamatória a essa drogas é menor nos animais velhos.

8. REFERÊNCIAS

AMORIM, J. H. et al. A genetic and pathologic study of a DENV2 clinical isolate capable of inducing encephalitis and hematological disturbances in immunocompetent mice. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44984, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23028722> >.

ANAND, S. K.; TIKOO, S. K. Viruses as Modulators of Mitochondrial Functions. **Adv Virol**, v. 2013, p. 738794, 2013. ISSN 1687-8639. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24260034> >.

ARRANZ, L. et al. Environmental enrichment improves age-related immune system impairment: long-term exposure since adulthood increases life span in mice. **Rejuvenation Res**, v. 13, n. 4, p. 415-28, Aug 2010. ISSN 1557-8577. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20707722> >.

BALSITIS, S. J. et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 2, p. e1000790, Feb 2010. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20168989> >.

BARRETO, D. F. et al. Histopathological and ultrastructural aspects of mice lungs experimentally infected with dengue virus serotype 2. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 2, p. 175-82, May 2007. ISSN 0074-0276 (Print)

0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426882> >.

BASU, A.; CHATURVEDI, U. C. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 287-99, Aug 2008. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522648> >.

BEAUMIER, C. M. et al. Cross-reactive memory CD8(+) T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. **J Infect Dis**, v. 197, n. 4, p. 608-17, Feb 15 2008. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275279> >.

BEAUMIER, C. M.; ROTHMAN, A. L. Cross-reactive memory CD4+ T cells alter the CD8+ T-cell response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. **Viral Immunol**, v. 22, n. 3, p. 215-9, Jun 2009. ISSN 1557-8976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19435418> >.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563266> >.

BLOMBERG, B. B.; FRASCA, D. Age effects on mouse and human B cells. **Immunol Res**, Nov 2013. ISSN 1559-0755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24203437> >.

BOONNAK, K. et al. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **J Virol**, v. 85, n. 4, p. 1671-83, Feb 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21123382 >.

BORDIGNON, J. et al. Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. **J Med Virol**, v. 79, n. 10, p. 1506-17, Oct 2007. ISSN 0146-6615 (Print)

0146-6615 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17705192 >.

BRABANT, M. et al. A flavivirus protein M-derived peptide directly permeabilizes mitochondrial membranes, triggers cell death and reduces human tumor growth in nude mice. **Apoptosis**, v. 14, n. 10, p. 1190-203, Oct 2009. ISSN 1573-675X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19693674> >.

BRIEN, J. D. et al. Key role of T cell defects in age-related vulnerability to West Nile virus. **J Exp Med**, v. 206, n. 12, p. 2735-45, Nov 2009. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901080> >.

BROWN, M. G. et al. Dengue virus infection of mast cells triggers endothelial cell activation. **J Virol**, v. 85, n. 2, p. 1145-50, Jan 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068256> >.

BRUNNER, S. et al. Persistent viral infections and immune aging. **Ageing Res Rev**, v. 10, n. 3, p. 362-9, Jul 2011. ISSN 1872-9649. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20727987> >.

CASTELO-BRANCO, C.; SOVERAL, I. The immune system and aging: a review. **Gynecol Endocrinol**, Nov 2013. ISSN 1473-0766. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24219599> >.

CASTLE, S. C. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 578-85, Aug 2000. ISSN 1058-4838 (Print)

1058-4838 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10987724>.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KALAYANAROOJ, S.; UBOL, S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 2, p. 365-75, Feb 2007. ISSN 0022-1317. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251552>>.

CHEN, H. C. et al. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. **J Virol**, v. 81, n. 11, p. 5518-26, Jun 2007. ISSN 0022-538X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360740>>.

CHEN, L. C. et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, n. 1, p. 142-7, Jan 2006. ISSN 0002-9637. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407359>>.

CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; MARKS, R. M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **J Virol**, v. 70, n. 12, p. 8765-72, Dec 1996. ISSN 0022-538X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8971005>>.

CLARK, K. B. et al. Can non-human primates serve as models for investigating dengue disease pathogenesis? **Front Microbiol**, v. 4, p. 305, 2013. ISSN 1664-302X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130557>>.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol**, v. 80, n. 23, p. 11418-31, Dec 2006. ISSN 0022-538X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16928749>>.

COSTA, V. V. et al. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. **Am J Pathol**, v. 182, n. 6, p. 1950-61, Jun 2013. ISSN 1525-2191. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23567637>>.

_____. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- γ in host resistance to infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1663, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666512>>.

CUNNINGHAM, C. et al. Systemic Inflammation Induces Acute Behavioral and Cognitive Changes and Accelerates Neurodegenerative Disease. **Biological Psychiatry**, v. 65, n. 4, p. 304-312, Feb 2009. ISSN 0006-3223. Disponível em: <<Go to ISI>://000263249900007>.

DA CONCEIÇÃO, T. M. et al. Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus. **Virology**, v. 435, n. 2, p. 281-92, Jan 2013. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23089253> >.

DAUGHADAY, C. C. et al. Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. **Infect Immun**, v. 32, n. 2, p. 469-73, May 1981. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7251133> >.

DE ARAÚJO, A. L. et al. Preventing or reversing immunosenescence: can exercise be an immunotherapy? **Immunotherapy**, v. 5, n. 8, p. 879-93, Aug 2013. ISSN 1750-7448. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902557> >.

DE ARAÚJO, J. M. et al. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 9, p. e1784, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22970331> >.

DE LA FUENTE, M.; MIQUEL, J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 26, p. 3003-26, 2009. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754376> >.

DE MIRANDA, A. S. et al. Dengue-3 encephalitis promotes anxiety-like behavior in mice. **Behav Brain Res**, v. 230, n. 1, p. 237-42, Apr 21 2012. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366269> >.

DE SOUSA, A. A. et al. Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e15597, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264301> >.

DE VEER, M. J. et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 6, p. 912-20, Jun 2001. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404376> >.

DE-OLIVEIRA-PINTO, L. M. et al. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e38527, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22815692> >.

DECMAN, V. et al. Cell-intrinsic defects in the proliferative response of antiviral memory CD8 T cells in aged mice upon secondary infection. **J Immunol**, v. 184, n. 9, p. 5151-9, May 1 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20368274 >.

FABBRI, M.; SMART, C.; PARDI, R. T lymphocytes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, n. 7, p. 1004-8, Jul 2003. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672468> >.

FAGUNDES, C. T. et al. IFN- γ production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 12, p. e1449, Dec 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22206036> >.

FALCONAR, A. K.; MARTINEZ, F. The NS1 glycoprotein can generate dramatic antibody-enhanced dengue viral replication in normal out-bred mice resulting in lethal multi-organ disease. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21024, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21731643> >.

FARBER, D. L.; YUDANIN, N. A.; RESTIFO, N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 1, p. 24-35, Jan 2014. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336101> >.

FAUCI, A. S. Infectious diseases: considerations for the 21st century. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 5, p. 675-85, Mar 1 2001. ISSN 1058-4838 (Print)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11229834 >.

FISCHER, C. P. et al. Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity. **Scand J Med Sci Sports**, v. 17, n. 5, p. 580-7, Oct 2007. ISSN 0905-7188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17076827> >.

FRIBERG, H. et al. Cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections in humans. **Sci Rep**, v. 1, p. 51, 2011. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22355570> >.

_____. Memory CD8⁺ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. **Immunol Cell Biol**, v. 89, n. 1, p. 122-9, Jan 2011. ISSN 1440-1711 (Electronic)

0818-9641 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20421879 >.

FURUTA, T. et al. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in Dengue shock syndrome. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1505, Feb 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363824> >.

GAGNON, S. J. et al. Identification of two epitopes on the dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross-reactive human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. **J Virol**, v. 70, n. 1, p. 141-7, Jan 1996. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8523518 >.

GARCIA-RIVERA, E. J.; RIGAU-PEREZ, J. G. Dengue severity in the elderly in Puerto Rico. **Rev Panam Salud Publica**, v. 13, n. 6, p. 362-8, Jun 2003. ISSN 1020-4989 (Print)

1020-4989 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12880516 >.

GAYOSO, I. et al. Immunosenescence of human natural killer cells. **J Innate Immun**, v. 3, n. 4, p. 337-43, 2011. ISSN 1662-8128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576928> >.

GIBBONS, R. V. et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 5, p. 910-3, Nov 2007. ISSN 1476-1645 (Electronic)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984352> >.

GIL, L. et al. Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 induce functional serotype-specific cell-mediated immunity in mice. **J Gen Virol**, v. 93, n. Pt 6, p. 1204-14, Jun 2012. ISSN 1465-2099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22398317> >.

GONÇALVES, D. et al. Immunocompetent mice model for dengue virus infection. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 525947, 2012. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666132> >.

GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. **Nat Immunol**, v. 14, n. 5, p. 428-36, May 2013. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598398> >.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, n. 5, p. 429-36, Oct 2006. ISSN 0951-7375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940865> >.

GUABIRABA, R.; RYFFEL, B. Dengue virus infection: Current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. **Immunology**, Oct 2013. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24182427> >.

GUBLER, D. J.; MELTZER, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Adv Virus Res**, v. 53, p. 35-70, 1999. ISSN 0065-3527 (Print)

0065-3527 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10582094> >.

GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Arch Virol**, v. 158, n. 7, p. 1445-59, Jul 2013. ISSN 1432-8798. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471635> >.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, Dec 2010. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079655> >.

_____. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **Int J Infect Dis**, v. 6, n. 2, p. 118-24, Jun 2002. ISSN 1201-9712 (Print)

1201-9712 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12121599 >.

GUZMÁN, M. G. et al. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **Int J Infect Dis**, v. 6, n. 2, p. 118-24, Jun 2002. ISSN 1201-9712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121599> >.

HALSTEAD, S. B. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Rev Infect Dis**, v. 11 Suppl 4, p. S830-9, 1989 May-Jun 1989. ISSN 0162-0886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2665015> >.

_____. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv Virus Res**, v. 60, p. 421-67, 2003. ISSN 0065-3527 (Print)

0065-3527 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689700> >.

_____. Dengue. **Lancet**, v. 370, p. 1644-1652, 2007.

HALSTEAD, S. B. et al. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 10, p. 712-22, Oct 2010. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883967> >.

HASCOËT, M.; BOURIN, M.; NIC DHONNCHADHA, B. A. The mouse light-dark paradigm: a review. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 25, n. 1, p. 141-66, Jan 2001. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11263750> >.

HOBBER, D. et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 3, p. 324-31, Mar 1993. ISSN 0002-9637 (Print)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8470771> >.

IP, P. P.; LIAO, F. Resistance to dengue virus infection in mice is potentiated by CXCL10 and is independent of CXCL10-mediated leukocyte recruitment. **J Immunol**, v. 184, n. 10, p. 5705-14, May 15 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20400703 >.

JESSIE, K. et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **J Infect Dis**, v. 189, n. 8, p. 1411-8, Apr 15 2004. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073678> >.

JIANG, J. et al. Limited expansion of virus-specific CD8 T cells in the aged environment. **Mech Ageing Dev**, v. 130, n. 11-12, p. 713-21, Nov-Dec 2009. ISSN 1872-6216 (Electronic)

0047-6374 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19744506 >.

JIANG, J.; FISHER, E. M.; MURASKO, D. M. Intrinsic defects in CD8 T cells with aging contribute to impaired primary antiviral responses. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 6, p. 579-86, Jun 2013. ISSN 1873-6815. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23473930> >.

JOHNSON, A. J.; ROEHRIG, J. T. New mouse model for dengue virus vaccine testing. **J Virol**, v. 73, n. 1, p. 783-6, Jan 1999. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9847388> >.

KALAYANAROOJ, S. et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. **J Infect Dis**, v. 176, n. 2, p. 313-21, Aug 1997. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237695> >.

KANGWANPONG, D.; BHAMARAPRAVATI, N.; LUCIA, H. L. Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the in situ PCR method: a case report. **Clin Diagn Virol**, v. 3, n. 2, p. 165-72, Feb 1995. ISSN 0928-0197 (Print)

0928-0197 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15566798> >.

KINOSHITA, D. et al. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. **Physiol Behav**, v. 96, n. 2, p. 328-32, Feb 16 2009. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027030> >.

KURANE, I.; ENNIS, F. E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Semin Immunol**, v. 4, n. 2, p. 121-7, Apr 1992. ISSN 1044-5323 (Print)

1044-5323 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1617166 >.

KYLE, J. L. et al. Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. **Virology**, v. 380, n. 2, p. 296-303, Oct 2008. ISSN 1096-0341. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18774583> >.

LAUGHLIN, C. A. et al. Dengue research opportunities in the Americas. **J Infect Dis**, v. 206, n. 7, p. 1121-7, Oct 2012. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782946> >.

LEE, S. Y. et al. Decreased levels of nuclear glucocorticoid receptor protein in the hippocampus of aged Long-Evans rats with cognitive impairment. **Brain Res**, v. 1478, p. 48-54, Oct 2012. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22971526> >.

LIN, Y. S. et al. Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 2, p. 213-21, 2004. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754400> >.

LINTERMAN, M. A. How T follicular helper cells and the germinal centre response change with age. **Immunol Cell Biol**, Nov 2013. ISSN 1440-1711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24217812> >.

LIU, C. C. et al. Transient CD4/CD8 ratio inversion and aberrant immune activation during dengue virus infection. **J Med Virol**, v. 68, n. 2, p. 241-52, Oct 2002. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12210415> >.

LOO, Y. M. et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. **J Virol**, v. 82, n. 1, p. 335-45, Jan 2008. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942531> >.

LU, M. Y.; LIAO, F. Interferon-stimulated gene ISG12b2 is localized to the inner mitochondrial membrane and mediates virus-induced cell death. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 6, p. 925-36, Jun 2011. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21151029> >.

LU, Y. S. et al. Methylprednisolone inhibits activated CD4+ T cell survival promoted by toll-like receptor ligands. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 9, n. 4, p. 376-83, Aug 2010. ISSN 1499-3872 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20688601 >.

MARCHETTE, N. J. et al. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. **J Infect Dis**, v. 128, n. 1, p. 23-30, Jul 1973. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4198025> >.

MAROVICH, M. et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v. 6, n. 3, p. 219-24, Dec 2001. ISSN 1087-0024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11924831> >.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunol Rev**, v. 225, p. 300-13, Oct 2008. ISSN 1600-065X (Electronic) 0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18837790> >.

MILLER, J. L. et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, p. e17, Feb 2008. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18266465> >.

MODHIRAN, N.; KALAYANAROOJ, S.; UBOL, S. Subversion of innate defenses by the interplay between DENV and pre-existing enhancing antibodies: TLRs signaling collapse. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 12, p. e924, 2010. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21200427> >.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nat Med**, v. 9, n. 7, p. 921-7, Jul 2003. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808447> >.

MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Emerging infectious diseases: threats to human health and global stability. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 7, p. e1003467, Jul 2013. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853589> >.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 242-9, Jul 8 2004. ISSN 1476-4687 (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15241422 >.

MOTA, J.; RICO-HESSE, R. Dengue virus tropism in humanized mice recapitulates human dengue fever. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20762, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21695193> >.

MURRAY, N. E.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clin Epidemiol**, v. 5, p. 299-309, 2013. ISSN 1179-1349. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990732> >.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DESPRÈS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate immune responses to dengue virus. **Arch Med Res**, v. 36, n. 5, p. 425-35, 2005 Sep-Oct 2005. ISSN 0188-4409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099317> >.

NGUYEN, M. D. et al. Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurosci**, v. 24, n. 6, p. 1340-9, Feb 2004. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960605> >.

NIELSEN, D. G. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. **Virol J**, v. 6, p. 211, 2009. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19941667> >.

NOGUEIRA, R. M.; DE ARAUJO, J. M.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Rev Panam Salud Publica**, v. 22, n. 5, p. 358-63, Nov 2007. ISSN 1020-4989 (Print)

1020-4989 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18198045 >.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 9, p. 1376-81, Sep 2005. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16229765> >.

PAES, M. V. et al. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. **Virology**, v. 338, n. 2, p. 236-46, Aug 2005. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961136> >.

PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 1, p. 43-5, Jan 2007. ISSN 0818-9641. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17130899> >.

PEAKE, J. M. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. **Exerc Immunol Rev**, v. 8, p. 49-100, 2002. ISSN 1077-5552. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690938> >.

PREMARATNA, R. et al. Repeated dengue shock syndrome and 'dengue myocarditis' responding dramatically to a single dose of methyl prednisolone. **Int J Infect Dis**, v. 16, n. 7, p. e565-9, Jul 2012. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521778> >.

PUCCIONI-SOHLER, M. et al. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. **Neurology**, v. 73, n. 17, p. 1413-7, Oct 27 2009. ISSN 1526-632X (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19858464 >.

RANJIT, S.; KISSOON, N. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. **Pediatr Crit Care Med**, v. 12, n. 1, p. 90-100, Jan 2011. ISSN 1529-7535. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20639791> >.

RICO-HESSE, R. Dengue virus virulence and transmission determinants. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 338, p. 45-55, 2010. ISSN 0070-217X (Print)

0070-217X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19802577 >.

ROTHMAN, A. L. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 338, p. 83-98, 2010. ISSN 0070-217X (Print)

0070-217X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19802580 >.

_____. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 532-43, Aug 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760609> >.

RUANGJIRACHUPORN, W.; BOONPUCKNAVIG, S.; NIMMANITYA, S. Circulating immune complexes in serum from patients with dengue haemorrhagic fever. **Clin Exp Immunol**, v. 36, n. 1, p. 46-53, Apr 1979. ISSN 0009-9104 (Print)

0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/380857> >.

SADLER, A. J.; WILLIAMS, B. R. Interferon-inducible antiviral effectors. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 7, p. 559-68, Jul 2008. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18575461> >.

SAPER, C. B.; SAWCHENKO, P. E. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. **J Comp Neurol**, v. 465, n. 2, p. 161-3, Oct 13 2003. ISSN 0021-9967 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12949777 >.

SERGERIE, Y. et al. Delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. **J Infect Dis**, v. 195, n. 6, p. 817-25, Mar 15 2007. ISSN 0022-1899 (Print)

0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299711> >.

SHEK, P. N. et al. Strenuous exercise and immunological changes: a multiple-time-point analysis of leukocyte subsets, CD4/CD8 ratio, immunoglobulin production and NK cell response. **Int J Sports Med**, v. 16, n. 7, p. 466-74, Oct 1995. ISSN 0172-4622. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550256> >.

SHU, S. Y.; JU, G.; FAN, L. Z. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neurosci Lett**, v. 85, n. 2, p. 169-71, Feb 29 1988. ISSN 0304-3940 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3374833 >.

SIMPSON, R. J. Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise "make space"? **Exerc Sport Sci Rev**, v. 39, n. 1, p. 23-33, Jan 2011. ISSN 1538-3008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21088603> >.

SIMPSON, R. J.; GUY, K. Coupling aging immunity with a sedentary lifestyle: has the damage already been done?--a mini-review. **Gerontology**, v. 56, n. 5, p. 449-58, 2010. ISSN 1423-0003 (Electronic)

0304-324X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20029165 >.

SIMPSON, R. J. et al. Exercise and the aging immune system. **Ageing Res Rev**, v. 11, n. 3, p. 404-20, Jul 2012. ISSN 1872-9649. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22465452> >.

SPIELMANN, G. et al. Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 8, p. 1521-9, Nov 2011. ISSN 1090-2139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784146> >.

ST JOHN, A. L.; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 420-6, Jun 2013. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652323> >.

ST JOHN, A. L. et al. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 22, p. 9190-5, May 31 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576486> >.

STYER, L. M. et al. Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 9, p. 1262-70, Sep 2007. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17941708> >.

SUAYA, J. A. et al. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 5, p. 846-55, May 2009. ISSN 1476-1645 (Electronic)

0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407136> >.

TAN, G. K. et al. Subcutaneous infection with non-mouse adapted Dengue virus D2Y98P strain induces systemic vascular leakage in AG129 mice. **Ann Acad Med Singapore**, v. 40, n. 12, p. 523-32, Dec 2011. ISSN 0304-4602. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22294063> >.

TASSANEETRITHEP, B. et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **J Exp Med**, v. 197, n. 7, p. 823-9, Apr 2003. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682107> >.

TEELING, J. L. et al. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 3, p. 409-19, Mar 2010. ISSN 1090-2139 (Electronic)

0889-1591 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19931610 >.

THOMAS, S. J.; STRICKMAN, D.; VAUGHN, D. W. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. **Adv Virus Res**, v. 61, p. 235-89, 2003. ISSN 0065-3527 (Print)

0065-3527 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14714434> >.

TSAI, T. T. et al. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. **J Biomed Sci**, v. 20, p. 40, 2013. ISSN 1423-0127. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800014> >.

TSAL, Y. T. et al. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 604-15, Apr 2009. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19134117> >.

TUISKUNEN, A. et al. Phenotypic characterization of patient dengue virus isolates in BALB/c mice differentiates dengue fever and dengue hemorrhagic fever from dengue shock syndrome. **Virology**, v. 8, p. 398, 2011. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835036> >.

UBOL, S.; HALSTEAD, S. B. How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 12, p. 1829-35, Dec 2010. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876821> >.

VALERO, N. et al. Differential oxidative stress induced by dengue virus in monocytes from human neonates, adult and elderly individuals. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73221, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069178> >.

VAN LAETHEM, F. et al. Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling. **J Exp Med**, v. 193, n. 7, p. 803-14, Apr 2001. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283153> >.

VELANDIA-ROMERO, M. L.; ACOSTA-LOSADA, O.; CASTELLANOS, J. E. In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. **J Neurovirol**, v. 18, n. 5, p. 374-87, Oct 2012. ISSN 1538-2443. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22825914> >.

VITARANA, T. et al. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. **Ceylon Med J**, v. 36, n. 2, p. 63-5, Jun 1991. ISSN 0009-0875 (Print)

0009-0875 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1913986> >.

WALSH, N. P. et al. Position statement. Part two: Maintaining immune health. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 64-103, 2011. ISSN 1077-5552. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21446353> >.

_____. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 6-63, 2011. ISSN 1077-5552. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21446352> >.

WANG, J. et al. Inhibitory effect of glutathione on oxidative liver injury induced by dengue virus serotype 2 infections in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55407, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23383181> >.

WANG, W. K. et al. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 8, p. 1023-30, Oct 15 2006. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983615> >.

WANG, X. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**, Nov 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24189435> >.

WENSVEEN, F. M. et al. Pro-apoptotic protein Noxa regulates memory T cell population size and protects against lethal immunopathology. **J Immunol**, v. 190, n. 3, p. 1180-91, Feb 2013. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23277490> >.

WILDER-SMITH, A. et al. DengueTools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. **Glob Health Action**, v. 5, 2012. ISSN 1654-9880. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22451836> >.

WILLIAMS, K. L. et al. A mouse model for studying dengue virus pathogenesis and immune response. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1171 Suppl 1, p. E12-23, Sep 2009. ISSN 1749-6632 (Electronic)

1749-6632 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19751398 >.

WOODS, J. A. et al. Effects of maximal exercise on natural killer (NK) cell cytotoxicity and responsiveness to interferon-alpha in the young and old. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 53, n. 6, p. B430-7, Nov 1998. ISSN 1079-5006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823739> >.

WU, S. J. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat Med**, v. 6, n. 7, p. 816-20, Jul 2000. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888933> >.

ZAREMBER, K. A.; GODOWSKI, P. J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. **J Immunol**, v. 168, n. 2, p. 554-61, Jan 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777946> >.

ZEALLEY, B.; DE GREY, A. D. Strategies for Engineered Negligible Senescence. **Gerontology**, Oct 2012. ISSN 1423-0003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23037635> >.

ZHAO, Y. M.; FRENCH, A. R. Mechanistic model of natural killer cell proliferative response to IL-15 receptor stimulation. **PLoS Comput Biol**, v. 9, n. 9, p. e1003222, Sep 2013. ISSN 1553-7358. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24068905> >.

ZOMPI, S.; HARRIS, E. Animal models of dengue virus infection. **Viruses**, v. 4, n. 1, p. 62-82, Jan 2012. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22355452> >.

ZOMPI, S. et al. Protection from secondary dengue virus infection in a mouse model reveals the role of serotype cross-reactive B and T cells. **J Immunol**, v. 188, n. 1, p. 404-16, Jan 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131327> >.

Environmental influences on antibody-enhanced dengue disease outcomes

**Daniel Guerreiro Diniz¹, César Augusto Raiol Fôro¹, Máira C Pereira Turiel¹,
Marcia CK Sosthenes¹, Sâmia Demachki¹, Giovanni Freitas Gomes¹, Carla M Damasceno
Rego¹, Marina Cutrim Magalhães¹, Brunno Gomes Pinho², Juliana Pastana Ramos³,
Samir M Moraes Casseb⁴, Maysa de Vasconcelos Brito⁴, Eliana Vieira Pinto da Silva⁴,
Marcio Roberto Teixeira Nunes⁴, José Antonio Picanço Diniz⁴, Colm Cunningham⁵,
Victor Hugh Perry⁶, Pedro F Costa Vasconcelos^{3,4,*}, Cristovam W Picanço Diniz¹**

¹Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil ²Centro de Estudos Superiores do Estado do Pará, Belém, PA, Brasil ³Universidade do Estado do Pará, Belém, PA, Brasil ⁴Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, Brasil

⁵Trinity College, Dublin 2, Ireland ⁶School of Biological Sciences, University of Southampton, Southampton, UK

Because an enriched environment (EE) enhances T-cell activity and T-lymphocytes contribute to immunopathogenesis during heterologous dengue virus (DENV) infections, we hypothesised that an EE increases dengue severity. To compare single serotype (SS) and antibody-enhanced disease (AED) infections regimens, serial intraperitoneal were performed with DENV3 (genotype III) infected brain homogenate or anti-DENV2 hyperimmune serum followed 24 h later by DENV3 (genotype III) infected brain homogenate. Compared AED for which significant differences were detected between the EE and impoverished environmental (IE) groups (Kaplan-Meier log-rank test, $p = 0.0025$), no significant differences were detected between the SS experimental groups (Kaplan-Meier log-rank test, $p = 0.089$). Survival curves from EE and IE animals infected with the AED regimen were extended after corticoid injection and this effect was greater in the EE than in the IE group (Kaplan-Meier log-rank test, $p = 0.0162$). Under the AED regimen the EE group showed more intense clinical signs than the IE group. Dyspnoea, tremor, hunched posture, ruffled fur, immobility, pre-terminal paralysis, shock and death were associated with dominant T-lymphocytic hyperplasia and presence of viral antigens in the liver and lungs. We propose that the increased expansion of these memory T-cells and serotype cross-reactive antibodies facilitates the infection of these cells by DENV and that these events correlate with disease severity in an EE.

Key words: experimental dengue infection - enriched environment -
antibody-enhanced dengue disease - serial dengue infection - T-lymphocytes

Clinical and pathological evidence implicating abnormal cytokine release as the main mediator of disease and an increased risk of severe dengue disease have been described during secondary dengue virus (DENV) infections (Kurane & Ennis 1992). Indeed elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)- α have been detected in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) patients (Vitarana et al. 1991, Hober et al. 1993, Nguyen et al. 2004) and the production of this cytokine was correlated with increased numbers of macrophages/monocytes (de-Oliveira-Pinto et al. 2012), which are potent phagocytic cells and primary targets for DENV infection (Kang-

DENV entry in the form of virus-antibody immune complexes (Mathew & Rothman 2008). In addition, recent studies have demonstrated that DENV-specific memory T-cells from a prior infection respond to heterologous DENV serotypes with an altered cytokine profile and that the level of activation and expansion of these memory cells during acute DENV infection correlates with the disease severity (Rothman 2010). In addition, significant cross reactivity between DENV serotypes was shown in CD8(+) T-cells after a naturally acquired primary infection with differential T-cell receptor signalling after stimulation with heterologous and heterologous peptides (Friberg et al. 2011). DENV entry is facilitated by the phagocytosis of immune complexes via Fc receptors on monocytes (Daughaday et al. 1981) and studies of immune responses have reported circulating immune complexes and complement activation during the fever-to-defervescence period in which haemorrhage, plasma leakage and/or circulatory failure occur in patients with DHF and/or OSS (Ruangjirachuporn et al. 1979, Wang et al. 2006).

In endemic areas, where DHF incidence remains high, mosquito vectors are abundant and multiple in-

Financial support: CNPq (300460/2005-8, 301955/2007-7, 471444/2006-5, 454737/2010-6), INCT-FHV/CNPq/CAPES/FAPESPA (573739/2008-0), FINEP/FADESP (01.04.0043.00), PROPESP-UFPA-FADESP SMMC, EVPS, JAPD, MRTN, CWPD and PFCV are supported by INCT-FHV/CNPq. CWPD is supported by IBNnet/FINEP. + Corresponding author: pedrovasconcelos@iec.pa.gov.br

Received 15 May 2012

Accepted 2 October 2012

wanpong et al. 1995, Jessie et al. 2004). These cells express all three classes of FC γ R making them especially prone to

fections are often thought to involve different serotypes (Gubler & Meltzer 1999, Thomas et al. 2003, Suaya et al. 2009). In addition, an analysis of repeated hospital admissions for dengue showed that at least 10% of re-peat dengue admission patients may correspond to a third or fourth infection with all secondary admissions due to secondary dengue infection (Gibbons et al. 2007). Because most DENV infections are asymptomatic, it is reasonable to assume that a number of patients from endemic areas hospitalised with severe dengue disease may have been exposed to multiple infections. Thus, we have compared the outcomes of two different models of DENV infection: one induced by serial infections with a single serotype (SS) and one induced by multiple sero-types of DENV to enhance the disease through antibody cross reactivity. In this report, we used albino Swiss mice to model antibody-enhanced dengue disease after multiple infections and tested the influence of enhanced T-cell mobilisation on dengue disease severity.

An enriched environment (EE) has been defined as that which offers social interactions with con-specifics and the stimulation of exploratory and motor behaviour with periodic changes in the variety of toys, ladders, tunnels, ropes, bridges and running wheels available for voluntary physical exercise. In contrast, an impoverished environment offers standard cages with reduced sensorial, motor and cognitive stimulation (van Praag et al. 2000). Recent studies have demonstrated that an EE enhances T-cell mobilisation during viral infections (de Sousa et al. 2011) and a greater number of infected target T-cells may contribute to higher viraemia and the excess cytokine levels observed in severe dengue disease (Boonnak et al. 2011). Therefore, we hypothesised that environmental enrichment would exacerbate the clinical symptoms and mortality of DENV infection.

MATERIALS AND METHODS

We used adult female albino Swiss mice obtained from an outbred colony at the Animal Care Facility of the Evandro Chagas Institute and the mice were handled in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institute of Health). All studies were approved by the institutional animal care committee of the Evandro Chagas Institute, protocol 0061/2009. The mice were maintained with 12-h dark and light cycles, at a room temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and had free access to water and food.

Experimental groups and inoculation - Fig. 1 shows the experimental time line. We performed serial intra-peritoneal (i.p.) injections following one of two experimental protocols. Under the first protocol [impoverished environmental (IE): $n = 13$; EE: $n = 15$] all subjects received i.p. injections every other day with infected brain homogenate containing 0.014–0.087 viral copies/mL of DENV3 (genotype III) (SS group) until the day of sacrifice. Under the second protocol (IE: $n = 18$; EE: $n = 16$), all subjects received i.p. injections with infected brain homogenate containing a similar number of viral copies of

DENV3 (genotype III) once per day for six days. The animals were i.p. inoculated with diluted anti-DENV2 hyperimmune serum containing anti-DENV2 antibodies (1:32 dilution) every other day. Each injection was followed 24 h later by injection with DENV3 (genotype III) infected brain homogenate until the day of sacrifice to simulate antibody-enhanced DENV disease (AED group). Animals were sacrificed when they exhibited severe clinical symptoms including dyspnoea, tremor, hunched posture, ruffled fur, immobility, pre-terminal paralysis, shock and death or when burrowing activity was below 40% for two consecutive weekly measurements. Control subjects received equal volumes and dilution of anti-DENV2 hyperimmune serum followed 24 h later by uninfected brain homogenate. On the 38th days post-inoculation (d.p.i.), the subjects in the AED group received a single intramuscular (i.m.) injection of glucocorticoid (26 mg/kg, 1:1 mixture of acetate and betamethasone sodium phosphate) to reduce T-lymphocyte proliferation and function and to determine the impact of glucocorticoids on the Kaplan-Meier survival curves. This combination of glucocorticoids becomes effective 30 min after injection and remains active for four weeks.

All animals from the two experiments were nine month old, female albino Swiss mice housed from weaning under either impoverished or enriched conditions

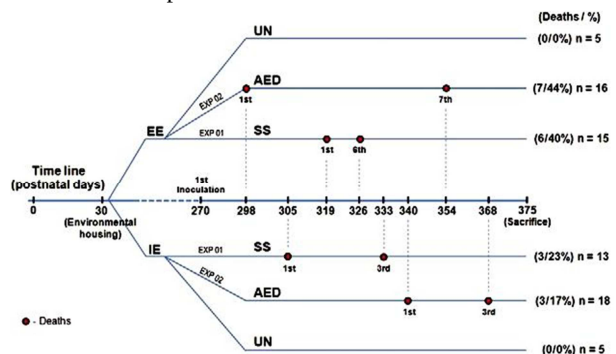


Fig. 1: experimental time line. Animals were housed either in enriched or impoverished environments on the 30th postnatal day. We performed serial intraperitoneal (i.p.) injections following one of two experimental protocols. In the 1st experiment (EXP 01) [impoverished environmental (IE) = 13; enriched environment (EE) = 15] all subjects received a series of every other day i.p. injections of infected brain homogenate [single serotype (SS) group] until the day of sacrifice. In the EXP 02 (IE $n = 18$; EE $n = 16$), all subjects received a series of i.p. injections of infected brain homogenate containing similar number of viral copies of dengue virus (DENV)3 (genotype III) once a day, during six days and then every other day they were i.p. inoculated with anti-DENV2 hyperimmune diluted serum containing anti-DENV2 antibodies (1:32), followed 24 h later by DENV3 (genotype III) infected brain homogenate until the day of sacrifice [antibody-enhanced DENV disease (AED) group]. The days of sacrifice were different in different animals and they coincided with the presence of clinical signs including dyspnoea, tremor, hunched posture, ruffled fur, immobility, pre-terminal paralysis, shock and deaths or alternatively when burrowing activity reduced below 40% during two consecutive weekly measurements. Control subjects received equal volumes and dilution of anti-DENV2 hyperimmune serum followed 24 h later by uninfected brain homogenate. Note that the number of deaths in EE groups (SS = 40%; AED = 44%) was significantly higher than in IE the groups (SS = 23%; AED = 17%). UN: uninfected group.

(Fig. 2, movie S1). Enriched conditions comprised of two-level wire cages (100 × 50 × 100 cm) with toys made of different forms of plastic, wood and metal of different colours, that were changed periodically. Each EE cage housed 15–20 young mice. Water and food were delivered to the top and bottom levels, respectively. Impoverished conditions consisted of plastic cages (32 × 39 × 100 cm) without equipment or toys. Each IE cage housed 15–20 young mice. All mice had free access to water and food.

Infected brain homogenates - Neonatal (2 day old) mice were intracerebrally infected with 10 µL of su-pernatant from C6/36 cells infected with either 1.33×10^3 or 7.78×10^3 cp/mL of DENV3 (genotype III) ob-tained from human serum samples (cases ROND 2929 and ROND 3115, respectively). Upon presenting clini-cal signs of infection, the animals were sacrificed and immediately stored at -70°C. Later, the brain tissue (0.2 g/animal) was macerated and mixed with 0.8 mL of phosphate -buffered saline (PBS) containing 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The suspension was centrifuged at 10,000 *g* for 15 min at room tempera-ture (16°C). The viral load (VL) in different tissues of the adult mice from the different experimental groups was estimated by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) when clinical symptoms became apparent.

Behavioural analysis - Burrowing - For 2 h per day (from 09:00 am–11:00 am) on two non- consecutive days the week before inoculation and two non-consecutive days between 2 d.p.i. and the day of sacrifice, each ani-mal was placed in a plastic cage (32 cm × 39 cm × 16.5 cm) containing a PVC tube (20 cm long, 7.2 cm diam-eter) filled with 100 g of normal diet food pellets with the open end supported 3 cm above the floor. After the testing period, the remaining food in the cylinder was weighed and the mouse was returned to its collective cage. Burrowing is an ethological task highly sensitive to systemic inflammation (Cunningham et al. 2009).

Open field - The apparatus consisted of a grey wood box (chipboard coated) (30 cm × 30 cm × 40 cm) with the floor divided into 10-cm squares. Once a week before inoculation and between d.p.i. 2 and the day of sacrifice, each animal was placed in the centre of the arena and

(Kinoshita et al. 2009). The open field test is a sensitive test for detecting sickness behaviour following a variety of viral infections, including dengue (de Miranda et al. 2012). A video camera connected to a computer was located 1 m above the open field and used to record each training session for later analysis with the Any-Maze software (Stöelting). The following parameters were analysed: distance travelled (m), mean speed (m/s), crossed lines and immobility time (s). After each test, the open field was cleaned with 70% ethanol.

Online Supplementary data is provided in video format to illustrate some aspects of the methodology and the main effects of the environmental influences on AED in our murine model (videos 1, 2).

After the behavioural tests, all diseased animals that showed a reduction of more than 60% in burrowing ac-tivity for two consecutive measurements (4 sessions) clinical disease signs (see Results) or clinical symptoms were sacrificed with i.p. 1% 2,2,2-tribromoethanol (0.01 mL/g of body weight). Three animals from each group were processed for histopathology.

Histology and immunohistochemistry - Mice were transcardially perfused with heparinised saline followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2–7.4). Livers and lungs, from five animals in each group were embedded in paraffin and sections (3 µm thick) were dewaxed in xylene, rehydrated with alcohols and stained with haematoxylin-eosin or immunolabelled to detect DENV3, CD-3, CD-15 and CD-20 antigens.

T and B lymphocytes - The specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Serial 3-µm cross-sections were made and the fragments were placed on glass slides previously treated with poly-D-lysine (Sigma Chemical Co, USA) and deparaffinised in xylene and descending ethanol series. Antigen retrieval was performed using pressure cooker heating (PAS-CAL[®], DakoCytomation, USA) in citrate buffer (10 mM, pH 6.0). After washing in PBS, the sections were im-mersed in 0.3% hydrogen peroxide for 5 min to block endogenous peroxidase activity and blocked with pro-teín for 10 min. The sections were then incubated in a dark wet chamber with primary monoclonal antibodies against CD3 (SP7 clone, dilution 1:400, DakoCytoma-tion, USA) or CD20 (L26 clone, dilution 1:600, Dako-Cytomation, USA) for 30 min then a secondary antibody followed by a streptavidin-biotin-peroxidase complex, each for 20 min at room temperature (DakoCytomation, USA). The slides were visualised with diaminobenzidine and counterstained with Harry's haematoxylin.

Microglia immunolabelling - Free-floating vibratome (70 µm thick) brain sections were pre-treated with 0.2 M boric acid (pH 9) at 65–70°C for 60 min to improve anti-gen retrieval. The sections were incubated with a poly-clonal antibody against ionised calcium binding adapter molecule 1 (2 µg/mL in PBS) to detect microglia and/or macrophages (anti-Iba1, #019-19741; Wako Pure Chemi-cal Industries Ltd, Osaka, Japan). Washed sections were then incubated overnight with a secondary antibody

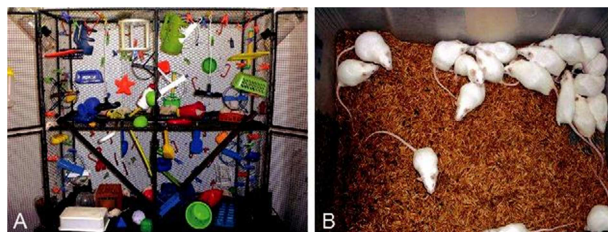


Fig. 2: environmental enrichment. Enriched environment (A) has been defined as social interactions with con -specifics and a stimulation of exploratory and motor behaviour with a variety of toys, ladders, tunnels, rope, bridges and running wheels for voluntary physical exercise changed periodically, as opposed to an impoverished environment (B) with reduced social interactions.

kept in the apparatus for 5 min, as previously described

(goat anti-rabbit, 1:250 in PBS, Vector Laboratories). Endogenous peroxidases were inactivated by immersion in 3% H_2O_2 in PBS. The PBS washed sections were transferred to a solution of avidin-biotin-peroxidase complex (VECTASTAIN ABC kit; Vector Laboratories) for 1 h. The DAB/Nickel/Glucose Oxidase protocol was used to reveal immunolabelled antigenic sites (Shu et al. 1988).

We confirmed the specificity of the immunohistochemical pattern by omitting the primary antibody (Saper & Sawchenko 2003).

RNA extraction - Viral RNA was extracted from the supernatant of infected C6/36 cells using a QIAquick RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

SYBR green quantitative RT-PCR (SYBR-qPCR) - qRT-PCR was performed using a commercial kit (Super-Script III Platinum SYBR[®] Green One -step qRT-PCR, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA). The reaction were performed in a final volume of 25 μ L containing 5 μ L of viral RNA (1-2 ng/ μ L), 0.5 μ L of SuperScript III RT Platinum Taq Mix, 0.2 μ M of each DENV primer (dos Santos et al. 2008), 12.5 μ L of $2 \times$ SYBR Green fluorescent dye and 1 μ L of ROX dye. The amplification was performed as follows: 50°C for 20 min, 95°C for 5 min, 45 cycles of 95°C for 15 s, 55°C for 40 s and 72°C for 30 s. The melting

curve was calculated during the incubation period from 60-90°C with a capture speed of 0.2°C/s. Each sample was analysed in duplicate wells. The SYBR- qRT-PCR results were expressed as genome copies/mL based on the standard curve constructed from the amplification of RNA extracted from C6/36 cells infected with the DENV-3 strain BH 692808 (stock in concentration: 3.1×10^6 genome copies/mL) and diluted from 10^{-1} to 10^{-6} . Estimations of the VL (genome copies/mL) in the C6-36 cell culture supernatants corresponding to the ROND 2929 and ROND 3115 human cases were 1.30×10^3 -1.33 $\times 10^3$ and 7.77×10^3 - 7.82×10^3 , respectively.

Standard curve - External standard curves were generated from serial dilutions of RNA derived from aliquots with known viral titres covering a range from 1×10^{-1} - 1×10^{-8} . A standard curve with eight points was amplified in duplicate along with non-template controls to determine the threshold value. Cycle threshold values from each RNA sample were compared with external standard curves to determine the corresponding virus loads in each tissue.

RESULTS

Clinical signs and survival - Burrowing and open field tests (movie S3) were performed in control animals until significant changes in both tests became apparent at 56 d.p.i. (Fig. 3A-D). After serial DENV3 single-sero-type inoculations, these changes were detected at eight

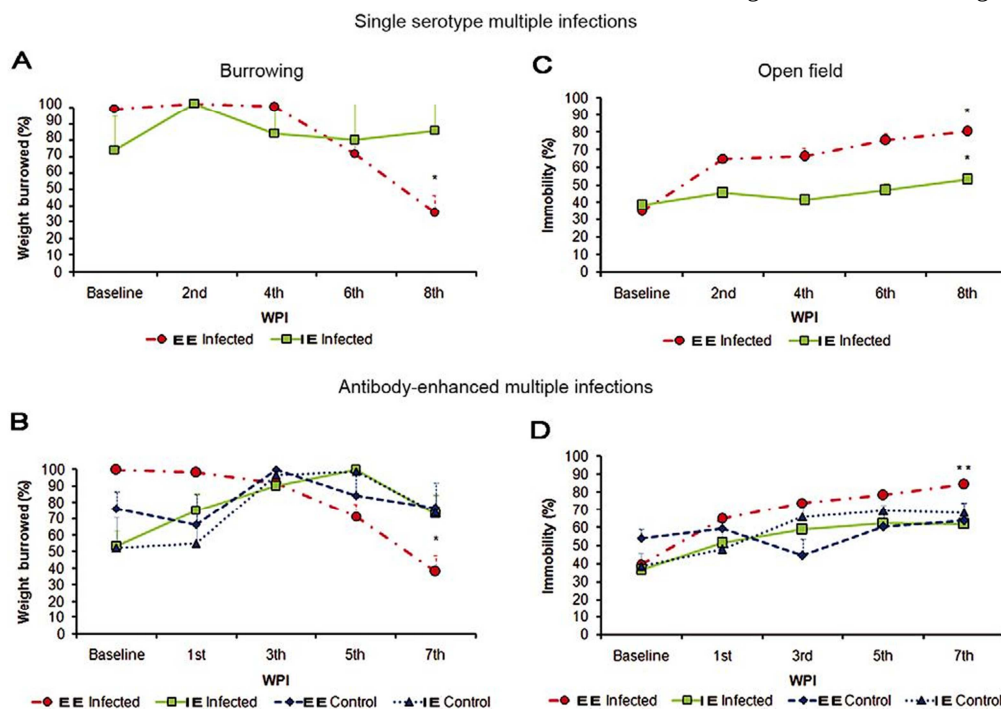


Fig. 3: sickness behaviour. Graphic representation of the behavioural changes with respective error bars in the albino Swiss mouse model of multiple single serotype multiple infections [A, C: single serotype (SS) group; B, D: antibody-enhanced dengue disease group (AED)]. As compared to baseline measurements, dengue virus (DENV)3 SS multiple infections induced significant decrease in borrowed food only in enriched environment (EE) subjects (A). On average, the subjects from EE ($n = 15$) submitted to AED showed, as compared with base line, significant less burrowed food at seven weeks post-inoculation (wpi) whereas the subjects with impoverished environmental (IE) ($n = 13$) did not change significantly (B). Open-field tests from all subjects submitted to serial SS infections (C) or to an AED (D) appeared significantly altered at 8 wpy. Control animals did not show any significant changes. Asterisks mean $p < 0.05$.

weeks post-inoculation (wpi) with a significant decrease in burrowed food for the EE animals (EE baseline = $96.82 \pm 8.21\%$ vs. EE 8 wpi = $35.04 \pm 9.31\%$; one-way ANOVA, Bonferroni *a priori* test, $p < 0.05$), but not for the IE animals (IE baseline = $72.31 \pm 6.94\%$ vs. $83.75 \pm 9.9\%$; $p > 0.05$) (Fig. 3A). In the antibody-enhanced dengue disease group at 7 wpi, the EE mice showed a significant decrease in burrowed food (EE baseline = $100\% \pm 2.74\%$ vs. EE 8 wpi = $34.23 \pm 16.95\%$), with a reduction of 65.77% (one-way ANOVA, Bonferroni *a priori* test, $p < 0.05$) whereas the IE mice did not change burrowing activity (Fig. 3B). In the open field tests at the same time points, all multiple single-serotype infected (Fig. 3C) and multiply infected, antibody-enhanced (Fig. 3D) groups showed a significant increase in immobility time. The multiple single-serotype infected groups housed an EE (57%) and IE (28%) as well as multiple infected AED housed in EE (45%) and IE (25.35%) showed increases in immobility time compared with baseline (one-way ANOVA, Bonferroni *a priori* test, $p < 0.05$). None of the control groups showed any significant changes. Although these clinical signs could be associated with central nervous system (CNS) changes, we did not observe any microglial morphological changes that could be interpreted as CNS inflammation (Supplementary data).

Fig. 4A illustrates the survival curves after multiple infections with a SS of DENV3. Although the EE mice presented higher rates of mortality and disease symptoms (40%) compared with the IE (23.1%) after multiple single-serotype infections, the Kaplan-Meier survival plot did not show any significant differences between the survival curves in this experiment (Kaplan-Meier log rank test $p = 0.089$). Compared with the mice subjected to the AED protocol, the mice that received multiple infections with a SS not only survived for longer periods post-challenge, but exhibited fewer clinical signs. Fol-

lowing the AED protocol (Fig. 4B), the EE mice showed earlier and more intense clinical signs, including dyspnoea, tremor, hunched posture, ruffled fur, immobility, pre-terminal paralysis, shock and deaths compared with the mice in the IE (Supplementary data, video 2). Kaplan-Meier analysis revealed significant differences in the survival probability curves of the AED experimental groups (uninfected, EE and IE; log-rank test, $p = 0.0025$) (Fig. 4B).

To prevent death and reduce clinical symptoms in the AED subjects, we injected the mice in this group with glucocorticoids at 38 d.p.i. After a single dose of glucocorticoids (arrow in Fig. 4C), clinical signs and deaths were reduced and the survival probability curve stabilized four- six weeks in the IE and EE experimental groups despite continued efforts to induce AED during this period by maintaining the regime of multiple inoculations. Approximately 50 days after the glucocorticoids injection, however, a progressive decline in the survival probability was observed. In the EE and IE groups, the AED animals injected with corticoids showed increased survival probabilities (log-rank test, $p = 0.016$).

There were no significant differences in the survival probability curves between the control and infected subjects treated with the SS protocol ($p = 0.089$), but the AED protocol did produce significant differences ($p = 0.0025$). In addition, a significant difference was observed between the AED regimen involving infection with multiple serotypes and the animals that were infected with multiple doses of a SS (SS = 68.13 ± 2.93 vs. AED = 54.37 ± 5.96 d.p.i.; two-tail T-test $p = 0.029$).

None of the control animals injected with uninfected brain homogenate showed any significant changes in survival probability.

Pathological changes after AED infection - The histological analysis of livers and lungs used a semiquanti-

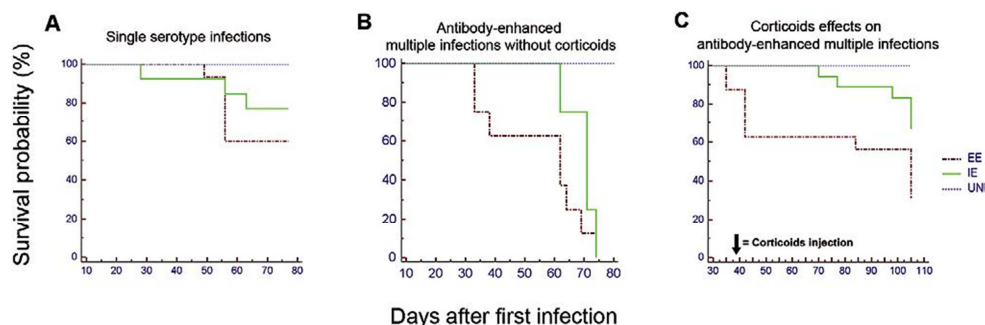


Fig. 4A: survival probability after serial single serotype (SS) dengue virus (DENV)3 multiple infections. Kaplan-Meier survival plot after SS DENV multiple infections. Note that as compared to the serial antibody-enhanced dengue disease (AED) (B), animals infected with a SS [DENV3 (genotype III)] survived for longer periods post-challenge without disease signs. Kaplan-Meier analysis of the survival probabilities did not reveal significant results (log rank test $p = 0.27$). Control animals did not show any change in the survival plot; B: survival probability after AED with no corticoids injection. Kaplan-Meier survival plot after AED infection (log rank test $p = 0.0025$). Note faster decrease of survival probability in the subjects from enriched environment as compared with subjects from impoverished environment (IE). To stop deaths and reduce the intensity of clinical symptoms we started glucocorticoid treatment (C). A plateau in the survival probability of experimental groups following glucocorticoid injection (arrow) suggests that the reduction of clinical symptoms and deaths during the plateau may be associated with an anti-inflammatory effect. Kaplan-Meier survival plot after AED infection (log rank test $p = 0.016$). Note faster decrease of survival probability in the subjects from enriched environment (EE) as compared with subjects from IE. Control animals did not show any significant differences. UN: uninfected group.

tative protocol to assess lesion severity. After treatment with the antibody-enhanced regimen involving multiple infections, the tissue samples showed frequent inflammatory infiltrates, dominated by T-lymphocytes (++++), and rare (+) B-lymphocytes (CD20⁺), macrophages (CD68⁺) and neutrophils (CD15⁺). The subjects housed in the enriched environments showed intense (++++)

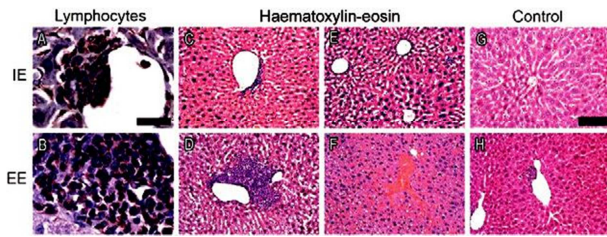


Fig. 5: liver pathology after antibody-enhanced dengue disease. Photomicrographs from immunolabelled (A-B) or haematoxylin-eosin (C-H) stained sections to illustrate pathological changes in the liver of impoverished environment (IE) ($n = 4$), enriched environment (EE) ($n = 4$) and control uninfected ($n = 4$) subjects. A, B: immunohistochemistry for T (CD3⁺) lymphocytes counterstained by Harry's haematoxylin. Note that the inflammatory mononuclear infiltration in the sub-endothelial space of peri-efferent veins was less intense (++) in IE (A, C) as compared with EE (++++), (B, D). Intense vascular congestion was found in EE (F). Steatosis, vascular congestion and mononuclear infiltration was rare and less intense (+) in the uninfected control subjects (G, H). [Bars = high power (25 μ m); low power (125 μ m)].

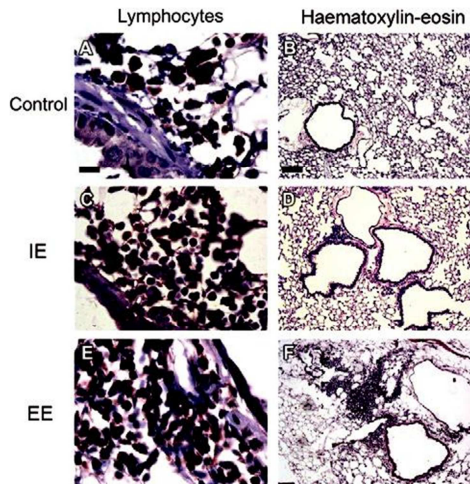


Fig. 6: lung pathology after antibody-enhanced dengue disease (AED). Photomicrographs from immunolabelled (A, C, E) and haematoxylin-eosin (H&E) (B, D, F) stained sections to illustrate pathological changes in the lungs of control uninfected ($n = 4$), impoverished environment (IE) ($n = 4$) and enriched environment (EE) ($n = 4$) subjects, after AED infection. A, C, E: immunohistochemistry for T (CD3⁺) lymphocytes counterstained by Harry's haematoxylin. Note that the inflammatory T (CD3) lymphocytic hyperplasia in the peribronchial space was less intense in IE (C) than in EE (E). Consistent with this, mononuclear infiltration in the peribronchial space, as revealed by H&E staining, was less intense in IE (D) as compared to EE (F). Mononuclear infiltration was not significant in the lungs of uninfected control subjects (A, B).

hyperplasia of T lymphocytes in the liver (Fig. 5B, D), whereas this was moderate (++) in the IE mice (Figs 4C, 5A) and rare (+) in the uninfected subjects (Fig. 5H). In addition, discrete tumefaction, microvesicular steatosis and Kupffer cell hypertrophy were detected in various liver lobules with the previously mentioned T lymphocytic hyperplasia around the efferent veins. Liver vascular congestion was mainly found in EE mice (Fig. 5F). These pathological features were rare and less intense in the uninfected subjects (Fig. 5G, H).

Similar inflammatory infiltrates with dominant T-lymphocytic hyperplasia were also presented in the peribronchial space (Fig. 6). Animals housed in the IE (Fig. 6C, D) showed a lesser degree of T-lymphocytic hyperplasia compared with those housed in the EE (Fig. 6E, F). These changes were less intense and rarely detected in the lungs of the uninfected control subjects (Fig. 6A, B).

To illustrate the presence of viral infection in the parenchyma we selected photomicrographs of sections from lungs (Fig. 7) and livers (Fig. 8) of infected animals under the AED multiple infections regime immunolabelled for viral antigens.

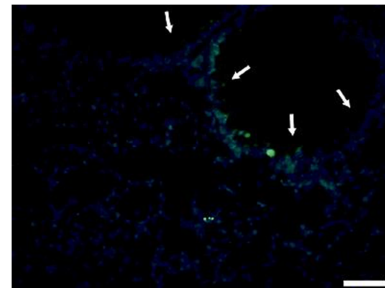


Fig. 7: photomicrograph of lung immunolabelled section from antibody-enhanced dengue disease individual obtained by indirect immunofluorescence to illustrate the presence of dengue virus (DENV)3 fluorescein labelled viral antigens (green), counterstained by 4'-6-diamidino-2-phenylindole fluorescence for DNA (blue) in the peribronchial space. Arrows indicate immunopositive cells for DENV3 antigens.

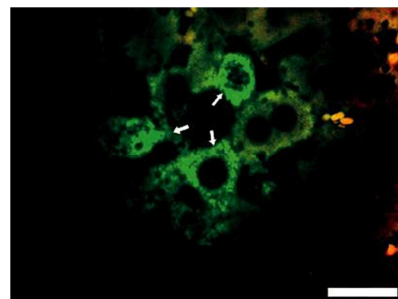


Fig. 8: photomicrograph of liver immunolabelled section from antibody-enhanced dengue disease individual obtained by indirect immunofluorescence to illustrate the presence of dengue virus (DENV)3 fluorescein labelled viral antigens (green) in the parenchyma near the peri-efferent vein. Arrows indicate immunopositive cells for DENV3 antigens.

qRT-PCR to detect DENV3 - Low viral titres were detected 24 h after the last DENV3 inoculation, at which time clinical signs became apparent. The highest concentrations of viral DNA were found in the livers of subjects housed in the EE (3.03 copies/mL). This was significantly different from the concentrations observed in the spleen (0.26 copies/mL) and lungs (0.003 copies/mL) of the same animals, but no significant differences were observed between the number of viral genome copies/mL in the EE and IE subjects.

DISCUSSION

In this study we tested the effects of environmental enrichment on dengue disease progression in a model of AED in adult female mice, in which serial inoculations of anti-DENV2 antibodies were followed 24 h later by inoculation with DENV3 (genotype III) infected brain homogenate. We found that subjects housed in EE with AED presented more intense clinical symptoms and higher mortality than subjects housed in impoverished environment and clinical signs were associated with T lymphocytic hyperplasia in the liver and lungs where we found cells expressing DENV antigens.

Under the of antibody-enhanced response regime, multiple inoculations with anti-DENV2 antibodies were followed 24 h later by inoculation with DENV3 genotype III. This regimen was associated with a higher number of deaths in the EE group than in the IE group. One hour after virus infection under this regime a number of the AED animals developed intense clinical signs with exuberant dyspnoea followed by death. TNF derived from DENV infected monocytes and activated T-cells has been proposed as a major mediator responsible for the deregulation of endothelial cells, which lead to plasma leakage (Halstead 2007). In addition, DENV infection causes mast-cell to trigger endothelial cell activation (Brown et al. 2011) and the release of vascular endothelial growth factor and proteases during dengue shock syndrome (Furuta et al. 2012); mast-cell numbers are also increased in peribronchiolar spaces and areas adjacent to the inter-alveolar septa (Barreto et al. 2007).

Taken together these data suggest that, during serial AED, environmental influences on disease progression might contribute to the disease severity by inducing an exacerbated inflammatory response. Indeed an EE has been shown to enhance T-cell activity during viral infections (de Sousa et al. 2011) and DENV is associated with increasing frequencies of interferon (IFN)- γ and TNF- α -producing T-cells after primary infection with all DENV serotypes; secondary infection enhances these responses (Beaumier et al. 2010). In a previous report, T-cell responses to sequential infections were measured after mice were immunized with different DENV serotypes and the frequency of peptide-specific T-cells after infection was determined (Beaumier et al. 2008). After heterologous secondary infection in BALB/c mice the acute response was enhanced compared with the acute response after primary infection (Beaumier et al. 2008). However, the passive administration of anti-DENV antibodies against one DENV serotype followed 24 h later by inoculation

of another serotype of DENV was sufficient to enhance DENV infection and disease in AG129 mice. This was the first model of AED lethal in vivo (Balsitis et al. 2010).

Because we did not assess any inflammatory mediators, it remains to be investigated whether increased cytokine production in subjects housed in EE may contribute to the differences in disease severity and mortality rates from subjects housed in impoverished environments.

In line with this hypothesis, the anti-inflammatory effects glucocorticoids injection stabilized the survival curves of both experimental groups for 50 days (see plateau following corticoid injection in Fig. 4C) which not occur in the individuals that did not received corticosteroids (Fig. 4B). Because corticosteroids reduce T-lymphocyte proliferation (Lu et al. 2010), we suggest that a relative decrease in the number of T-lymphocytes following glucocorticoid injection may explain the reduction in mortality and disease symptoms. A previous report demonstrated that dexamethasone completely inhibits cytokine production after a peripheral challenge with lipopolysaccharide (Teeling et al. 2010). Delayed but not early glucocorticoid treatment has also been shown to protect the host, increase survival and decrease cerebral damage during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice (Sergeie et al. 2007). Because delayed administration of glucocorticoids reduced death and disease severity after serial AED it is reasonable to suggest that the cytokine storm previously observed in secondary DENV infection

(Rothman 2009, Guabiraba et al. 2010, Tan et al. 2010) and AED (Balsitis et al. 2010) may be inhibited by corticoids (Sergeie et al. 2007).

A previous report showed a single intracerebral inoculation with DENV-3 (genotype I) induced neurological disease and death in mice, whereas DENV-3 (genotype III) did not (Ferreira et al. 2010). Consistent with this result, we showed that neither neurological clinical signs such as pre-terminal paralysis nor behavioural changes, such as a 60% reduction in burrowing activity were accompanied by evident pathology in the CNS (Supplementary data).

However, the results obtained with the singly-serotype regimen suggest that the adaptive immune response may have induced efficient protection against primary DENV infection. Indeed no significant differences were found between the experimental groups under the SS multiple infections protocol. The resistance to dengue infection after primary infection may be consistent with previous results showing that the resistance was not due to a defect in the recruitment of effector lymphocytes, but rather to the antiviral activity of those cells, which promoted viral clearance (Ip & Liao 2010). Consistent with this hypothesis, antiviral activity that promotes viral clearance in a manner that depends on IFN- γ and TNF- α -producing T-cells directed at H-2Db-restricted epitopes (Friberg et al. 2011) may be responsible for the resistance of mice to primary infection by dengue virus. We suggested that a serial SS infection may mimic a severe primary dengue infection in which others have described a cytokine storm associated with a T-lymphocyte response, that is mostly responsible for the development of disease rather than protection against severe infection (Rothman 2009, Guabiraba et al. 2010).

We report for the first time that after a regimen of multiple infections associated with and AED model, animals maintained in an EE showed more intense clinical symptoms and behavioural changes with lower disease resolution compared with animals maintained in impoverished housing.

REFERENCES

- Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, Johnson S, Diamond MS, Beatty PR, Harris E 2010. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog* 6: e1000790.
- Barreto DF, Takiya CM, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Farias-Filho J da C, Barth OM 2007. Histopathological and ultrastructural aspects of mice lungs experimentally infected with dengue virus serotype 2. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 175-182.
- Beaumier CM, Mathew A, Bashyam HS, Rothman AL 2008. Cross-reactive memory CD8(+) T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *J Infect Dis* 197: 608-617.
- Beaumier CM, Jaiswal S, West KY, Friberg H, Mathew A, Rothman AL 2010. Differential *in vivo* clearance and response to secondary heterologous infections by H2(b)-restricted dengue virus-specific CD8⁺ T cells. *Viral Immunol* 23: 477-485.
- Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, Tassaneetrithep B, Marovich MA 2011. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol* 85: 1671-1683.
- Brown MG, Hermann LL, Issekutz AC, Marshall JS, Rowter D, Al-Afif A, Anderson R 2011. dengue virus infection of mast cells triggers endothelial cell activation. *J Virol* 85: 1145-1150.
- Cunningham C, Champion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JFC, Deacon RMJ, Rawlins JNP, Perry VH 2009. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol Psychiatry* 65: 304-312.
- Daughaday CC, Brandt WE, McCown JM, Russell PK 1981. Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun* 32: 469-473.
- de Miranda AS, Rodrigues DH, Amaral DC, de Lima Campos RD, Cicalpino D, Vilela MC, Lacerda-Queiroz N, de Souza KP, Vago JP, Campos MA, Kroon EG, da Gloria de Souza D, Teixeira MM, Teixeira AL, Rachid MA 2012. Dengue-3 encephalitis promotes anxiety-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 230: 237-242.
- de-Oliveira-Pinto LM, Gandini M, Freitas LP, Siqueira MM, Marinho CF, Setúbal S, Kubelka CF, Cruz OG, de Oliveira SA 2012. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1 β and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 48-56.
- de Sousa AA, Reis R, Bento-Torres J, Trevia N, Lins NA, Passos A, Santos Z, Diniz JA, Vasconcelos PF, Cunningham C, Perry VH, Diniz CW 2011. Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. *PLoS ONE* 6: e15597.
- dos Santos HW, Poloni TR, Souza KP, Muller VD, Tremeschin F, Nali LC, Fantinatti LR, Amarilla AA, Castro HL, Nunes MR, Casseb SM, Vasconcelos PF, Badra SJ, Figueiredo LT, Aquino VH 2008. A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *J Med Virol* 80: 1426-1433.
- Ferreira GP, Figueiredo LB, Coelho LF, PA Jr S, Cecilio AB, Ferreira PC, Bonjardim CA, Arantes RM, Campos MA, Kroon EG 2010. Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. *Microbes Infect* 12: 546-554.
- Friberg H, Burns L, Woda M, Kalayanarooj S, Endy TP, Stephens HA, Green S, Rothman AL, Mathew A 2011. Memory CD8⁺ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. *Immunol Cell Biol* 89: 122-129.
- Furuta T, Murao LA, Lan NT, Huy NT, Huong VT, Thuy TT, Tham VD, Nga CT, Ha TT, Ohmoto Y, Kikuchi M, Morita K, Yasunami M, Hirayama K, Watanabe N 2012. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1505.
- Gibbons RV, Kalanarooj S, Jarman RG, Nisalak A, Vaughn DW, Endy TP, Mammen Jr MP, Srikiatkachorn A 2007. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever and serotype sequences. *Am J Trop Med Hyg* 77: 910-913.
- Guabiraba R, Marques RE, Besnard AG, Fagundes CT, Souza DG, Ryffel B, Teixeira MM 2010. Role of the chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue infection in mice. *PLoS ONE* 5: e15680.
- Gubler DJ, Meltzer M 1999. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res* 53: 35-70.
- Halstead SB 2007. Dengue. *Lancet* 370: 1644-1652.
- Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, Imbert P, Pecarere JL, Vergez-Pascal R, Wattré P, et al. 1993. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 48: 324-331.
- Ip PP, Liao F 2010. Resistance to dengue virus infection in mice is potentiated by CXCL10 and is independent of CXCL10-mediated leukocyte recruitment. *J Immunol* 184: 5705-5714.
- Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *J Infect Dis* 189: 1411-1418.
- Kangwanpong D, Bhamarapravati N, Lucia HL 1995. Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the *in situ* PCR method: a case report. *Clin Diagn Virol* 3: 165-172.
- Kinoshita D, Cohn DW, Costa-Pinto FA, de Sa-Rocha LC 2009. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. *Physiol Behav* 96: 328-332.
- Kurane I, Ennis FE 1992. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol* 4: 121-127.
- Lu YS, Pu LY, Li XC, Wang XH 2010. Methylprednisolone inhibits activated CD4⁺ T cell survival promoted by toll-like receptor ligands. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 9: 376-383.
- Mathew A, Rothman AL 2008. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev* 225: 300-313.
- Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, Lin CF, Yeh TM, Do QH, Vu TQ, Chen LC, Huang JH, Lam TM, Liu CC, Halstead SB 2004. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis* 189: 221-232.
- Rothman AL 2009. T lymphocyte responses to heterologous secondary dengue virus infections. *Ann NY Acad Sci* 1171: e36-41.
- Rothman AL 2010. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 338: 83-98.
- Ruangjirachupom W, Boonpucknavig S, Nimmanitya S 1979. Circulating immune complexes in serum from patients with dengue haemorrhagic fever. *Clin Exp Immunol* 36: 46-53.
- Saper CB, Sawchenko PE 2003. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 465: 161-163.

- Sergerie Y, Boivin G, Gosselin D, Rivest S 2007. Delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. *J Infect Dis* 195: 817-825.
- Shu SY, Ju G, Fan LZ 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 85: 169-171.
- Suaya JA, Shepard DS, Siqueira JB, Martelli CT, Lum LC, Tan LH, Kongsin S, Jiamton S, Garrido F, Montoya R, Armien B, Huy R, Castillo L, Caram M, Sah BK, Sughayyar R, Tyo KR, Halstead SB 2009. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg* 80: 846-855.
- Tan GK, Ng JK, Trasti SL, Schul W, Yip G, Alonso S 2010. A non mouse-adapted dengue virus strain as a new model of severe dengue infection in AG129 mice. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e672.
- Teeling JL, Cunningham C, Newman TA, Perry VH 2010. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: implications for a role of COX-1. *Brain Behav Immun* 24: 409-419.
- Thomas SJ, Strickman D, Vaughn DW 2003. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology and emergence. *Adv Virus Res* 61: 235-289.
- van Praag, Kempermann G, Gage FH 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1: 191-198.
- Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C 1991. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med J* 36: 63-65.
- Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, Lin SC, Ho ST, Huang JH, King CC 2003. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology* 305: 330-338.
- Wang WK, Chen HL, Yang CF, Hsieh SC, Juan CC, Chang SM, Yu CC, Lin LH, Huang JH, King CC 2006. Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 43: 1023-1030.

AGING AND ENVIRONMENTAL ENRICHMENT EXACERBATE INFLAMMATORY RESPONSE ON ANTIBODY-ENHANCED DENGUE DISEASE IN IMMUNOCOMPETENT MURINE MODEL

D.G. DINIZ¹, C.A.R. FORO¹, M.C.K. SOSTHENES¹, S. DEMACHKI¹ G.F. GOMES¹, G.A. MALERBA¹, T.B. NAVES¹, E.A.D. CAVALCANTE¹, A.M.C. SOUSA¹, F.A.B. FERREIRA¹, P.C.S. ANJOS¹, A.L.C. NETO³, B.G. PINHO², M.V. BRITO⁴, P.S.L. FREITAS⁴, S.M.M. CASSEB⁴, E.V.P. SILVA⁴, M.R.T. NUNES⁴, J.A.P. DINIZ⁴, C. CUNNINGHAM⁵, V.H. PERRY⁶, P.F.C. VASCONCELOS⁴ and C.W.P. DINIZ¹

¹Universidade Federal do Pará, UFPA, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém, Pará, Brazil; ²Centro de Estudos Superiores do Estado do Pará - CESUPA, Belém, Pará, Brazil; ³Universidade do Estado do Pará - UEPA, Belém, Pará, Brazil; ⁴Instituto Evandro Chagas, IEC, Departamento de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Ananindeua, Pará, Brazil; ⁵School of Biochemistry and Immunology, Trinity College Institute of Neuroscience, Trinity College, Dublin, Ireland; ⁶Centre for Biological Sciences, University of Southampton, Southampton, UK

Received April 9, 2013 – Accepted September 5, 2013

We previously demonstrated in young mice that in comparison with animals raised in an impoverished environment (IE), animals from an enriched environment (EE) show more severe dengue disease, associated with an increased expansion of memory T target cells. Because active older adults show less functional decline in T-cell adaptive immunity, we hypothesized that aged mice from EE would show higher mortality and T-lymphocyte expansion than mice from IE. To test this hypothesis, we administered serial i.p. injections of anti-DENV2 hyperimmune serum, followed 24 h later by DENV3 (genotype III)-infected brain homogenate. Control mice received equal volumes of serum but received uninfected brain homogenate. The presence of virus or viral antigens was indirectly detected by real-time quantitative RT-PCR and immunohistochemistry. Compared to infected IE animals, EE mice, independent of age, showed higher mortality and more intense clinical signs. Compared to young mice, the higher mortality of aged mice was associated with a higher degree of T lymphocytic hyperplasia in the spleen and infiltration in kidneys, liver, and lungs, but less viral antigen immunolabeling. We propose that a higher expansion of T cells and serotype cross-reactive antibodies are associated with disease severity in aged mice.

Recent studies demonstrated that memory T cells specific for dengue virus (DENV) from a prior

Key words: dengue infection, immunocompetent mice model, aging, environment, serial antibody-enhanced dengue disease, T lymphocytes and inflammation

Mailing address:

Cristovam Wanderley Picanço Diniz, MD,
PhD Universidade Federal do Pará, UFPA,
Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Investigações
em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João
de Barros Barreto, Munducurus, nº 4487,
Cep: 66.073-005. Belém, Pará,
Brazil Tel./Fax: +55(91)32016756

e-mail: cwpdiniz@gmail.com

1721-727X (2013)

Copyright © by BIOLIFE, s.a.s. This publication and/or article is for individual use only and may not be further reproduced without written permission from the copyright holder. Unauthorized reproduction may result in financial and other penalties

DISCLOSURE: ALL AUTHORS REPORT NO CONFLICTS OF INTEREST RELEVANT TO THIS ARTICLE.

infection respond with altered cytokine production to heterologous DENV serotypes and that the level of activation and expansion of these memory cells during acute DENV infection correlates with disease severity (1). On the other hand, serotype cross-reactive antibodies facilitate dengue virus infection of myeloid cells by promoting virus entry via Fc receptors, a process known as antibody-dependent enhancement (2), and passive administration of anti-DENV antibodies is sufficient to enhance dengue virus infection and disease in mice (3). Thus, cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections (4) may contribute to the higher viremia and excess cytokine levels observed in severe disease (5).

Several studies using immunocompetent, immunocompromised and humanized mice have been developed to analyze various aspects of dengue disease, but the development of a suitable animal model for DENV infection has been hampered by the low level or lack of replication of DENV clinical isolates in wild-type mice and the lack of clinical disease in non-human primates (6). In a previous report, we described development of antibody-enhanced dengue disease in an immunocompetent mouse model submitted to a regimen of serial infections as can occur in endemic areas where dengue hemorrhagic fever incidence remains high, mosquito vectors are abundant, and multiple infections involve different serotypes (7-9). Indeed, at least 10% of repeated dengue-related hospital admissions may correspond to a third or fourth infection with all secondary admissions arising from secondary dengue infection (10). In our model, we demonstrated that after DENV antibody-enhanced multiple infections, mice raised in an enriched environment (EE) showed earlier and more intense clinical signs than animals raised in an impoverished environment (IE). All infected symptomatic EE animals showed a higher degree of T lymphoid hyperplasia in liver and lungs than did IE mice (11).

In addition, it has been previously demonstrated that glucocorticoids reduce mortality rate after DENV infection (11) and inflammatory response after LPS-induced sickness behavior (12).

Based on previous demonstrations that physically active older adults show less functional decline in T and B cell-mediated adaptive immunity than age-

matched adults with a sedentary life style (13), we decided to test the hypothesis that antibody-enhanced dengue disease would be more severe in older adult mice maintained in EE than in age-matched IE individuals and that glucocorticoids may contribute to reduce deaths and clinical signs in aged mice. Based on previous descriptions that case fatality and hospitalization rates after dengue infection are higher in elderly compared to younger patients (14), we predicted that mortality after antibody-enhanced dengue disease would be higher in aged (18 months old) than in young (9 months old) mice.

MATERIALS AND METHODS

Experimental groups and inoculation

All studies were approved by the institutional animal care committee of the Evandro Chagas Institute, under protocol No. 0061/2009. All mice were obtained from an outbred colony at the Animal Care Facility of the Evandro Chagas Institute, and mice were handled in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institute of Health). Seventy adult female albino Swiss mice, 9 months old (young, $n = 44$) and 18 months old (aged, $n = 26$) were housed from weaning in an enriched (EE, $n = 34$) or impoverished environment (IE, $n = 36$). These animals formed two experimental groups, aged and young, with four subgroups each: aged enriched (uninfected, UN, $n = 5$; infected, AED, $n = 8$) and aged impoverished (UN, $n = 5$ and AED, $n = 8$), and young enriched (UN, $n = 5$, and AED, $n = 16$), and young impoverished (UN, $n = 5$ and AED, $n = 18$).

Housing conditions and experimental time line

Enriched conditions comprised 2-level wire cages ($100 \times 50 \times 100$ cm) equipped with ropes, rod bridges, tunnels, running wheels, and toys (Fig. S2A). Impoverished conditions comprised plastic cages ($32 \times 39 \times 100$ cm) without equipment or toys (Fig. S2B). Each cage housed 15–20 young or aged mice.

Fig. 1 illustrates the experimental timeline for all groups. All animals received a series of i.p. injections of infected brain homogenate containing a similar number of viral copies (0.014–0.087 viral copies/ml) of DENV3 genotype III, once a day for 6 days. Then every other day, they were i.p. inoculated with anti-DENV2 hyperimmune diluted serum containing anti-DENV2 antibodies (1:32), followed 24 h later by infected brain homogenate containing a similar number of viral copies of DENV3 (genotype III) until the day of sacrifice (AED groups in the timeline). Aged and young groups received the first

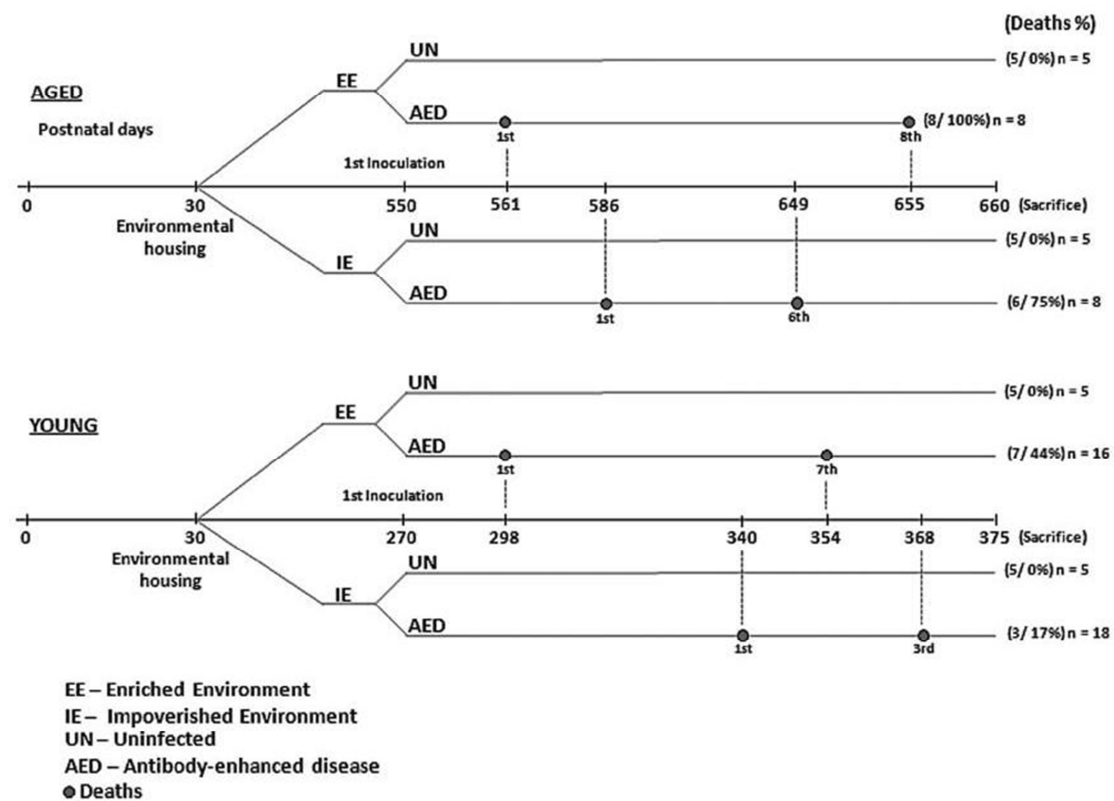


Fig. 1. Experimental timeline for all groups. Animals were raised from weaning in an enriched or impoverished environment. Aged and young groups received the first inoculation on the 550th and 270th days, respectively. The days of sacrifice were different in different animals and coincided with the presence of clinical signs or alternatively when burrowing activity fell below 40% during two consecutive weekly measurements. First death occurred respectively at 11 and 28 days after first inoculation of aged and young mice. All animals from infected groups received a series of i.p. injections of infected brain homogenate containing a similar number of viral copies of DENV3 genotype III once a day for 6 days; then every other day, they were i.p. inoculated with anti-DENV2 antibodies (1:32), followed 24 h later by infected brain homogenate until the day of sacrifice (AED groups in the timeline). Control animals (UN groups in timeline) received equal volumes and dilution of anti-DENV2 hyperimmune serum followed 24 h later by uninfected brain homogenate, and no deaths were detected in these groups.

inoculation on the 550th and 270th days, respectively. The days of sacrifice were different in different animals and coincided with the presence of clinical signs including dyspnea, tremor, hunched posture, ruffled fur, immobility, pre-terminal paralysis, shock, and death or alternatively when burrowing activity fell below 40% in two consecutive weekly measurements. First death in the aged and young groups occurred 11 and 28 days after the first inoculation, respectively. Control animals (UN groups in the timeline) received equal volumes and dilution of anti-DENV2 hyperimmune serum followed 24 h later by uninfected brain homogenate, and no deaths occurred in these groups.

Infected brain homogenates

Neonate (2 days old) mice were intracerebrally infected with 10 μ l of supernatants of infected C6/36 cells with 1.33

$\times 10^3$ or 7.78×10^3 cp/ml of DENV3 (genotype III) obtained from human serum samples from cases ROND 2929 and ROND 3115, respectively. Upon presenting clinical signs of infection, the animals were sacrificed and immediately stored at -70°C . Later, the brain tissue (0.2 g/animal) was macerated and mixed with 0.8 ml PBS containing 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. The suspension was cleared by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 15 min at room temperature (16°C). Viral load in different tissues of adult mice from distinct experimental groups were estimated by RT-PCR when clinical symptoms became apparent.

Behavioral analysis

Mice were kept from postnatal day 30 until age 9 or 18 months in impoverished or enriched housing and then submitted to the burrowing and open field tests. Open

field results were inconclusive, but burrowing tests proved to be very sensitive for detecting sickness behavior, as previously described after peripheral systemic challenges to simulate (15) or induce real acute viral infections (16).

Burrowing evaluation was carried out, 2 h daily (from 09:00 to 11:00 h) for three alternating days during one week before inoculation and three alternate days from post-inoculation day 2 to the day of sacrifice. See supplementary video images from a previous publication for mice burrowing activity (21).

After behavioral tests, all diseased animals that showed a reduction of more than 60% in burrowing activity for two consecutive measurements (four sessions) or clinical disease signs such as dyspnea, tremor, hunched posture, ruffled fur, immobility, or preterminal paralysis, were sacrificed with intraperitoneal 2,2,2-tribromoethanol 1% (0.01 ml/g of body weight). Four animals of each group were processed for histopathological analysis.

Histology and immunohistochemistry

Mice were transcardially perfused with heparinized saline followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2–7.4). Liver, lung, kidney, and spleen from five animals of each group were paraffin embedded, and sections (3 μ m thick) were dewaxed in xylene, rehydrated through alcohols, and stained with hematoxylin–eosin or immunolabeled. Selected sections for immunolabeling were incubated in a dark wet chamber with primary monoclonal antibody CD3 (SP7 clone, dilution 1:400, Dako Cytomation, USA), CD4 (clone 4B12, Dako Cytomation, USA); CD8 (clone C8/144B, dilution 1:400, Dako Cytomation, USA) CD20 (L26 clone, dilution 1:600, DakoCytomation, USA) or polyclonal antibody against DENV NS1 glycoprotein (ab41616, dilution 1:20, ABCAM, USA) for 30 min and biotin or fluorescein labeled secondary antibodies, followed by streptavidin–biotin–peroxidase or indirect immunofluorescence to reveal DENV3 fluorescein labeled viral antigens (green). Some immunofluorescent labeled sections were counterstained by ethidium bromide for DNA (red). Sections were exposed to the 2nd antibodies for 20 min at room temperature. We confirmed the specificity of the immunohistochemical pattern by omitting the primary antibody (Saper and Sawchenko, 2003).

RNA extraction

Viral RNA was extracted from supernatant of infected C6/36 cells using the QIAquick RNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.

SYBR quantitative real-time PCR (SYBRqPCR)

Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) was

performed using a commercial kit (SuperScript III Platinum SYBR® Green On-step qRT-PCR, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the ABI Prism 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The reaction was performed in a final volume of 25 μ l containing 5 μ l of viral RNA (1–2 ng/ μ l), 0.5 μ l of SuperScript III RT Platinum Taq Mix, 0.2 μ M of each DENV primer (Dos Santos et al., 2008), 12.5 μ l of 2 $\times$ SYBR Green fluorescent molecule, and 1 μ l of ROX dye. The amplification was run as follows: 50°C for 20 min; 95°C for 5 min; and 45 cycles of 95°C for 15 s, 55°C for 40 s, and 72°C for 30 s. The melting curve was calculated during the incubation period from 60°C to 90°C with a capture speed of 0.2°C/s. Each sample was run in duplicate wells. Quantification by the SYBR qRT-PCR was expressed in genome copies/ml based on the standard curve constructed from amplification values of RNA extracted from C6/36 cells infected with DENV-3 strain BH 692808 (stock in 3.1×10^6 genome copies/ml) diluted from 10^{-1} to 10^{-6} . Estimations of the viral load (genome copies/ml) in the C6-36 cell culture supernatants correspondent to ROND 2929 and ROND 3115 human cases were 1.30×10^3 – 1.33×10^3 and 7.77×10^3 – 7.82×10^3 , respectively.

Standard curve

External standard curves were generated by serial dilutions of RNA, derived from aliquots with known input virus titers, covering a range from 1×10^{-1} to 1×10^{-8} . Eight points for the standard curve were run in duplicate along with non-template controls to set the threshold value. Cycle threshold (Ct) values from each RNA sample were compared with external standard curves to determine related virus loads in each tissue. RT-PCR primers and respective sequences used to quantify DENV in the present report were as follow: RNC5-S: 5' AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA 3'; RNC5-C: 5' CGC GTT TCA GCA TAT TGA AAG 3'.

Photomicrographic documentation and processing

Digital photomicrographs were taken with a digital camera (Microfire, Optronics, CA, USA) coupled to a Nikon microscope (Optiphot-2, NY, USA). Digital photomicrographs were processed with Adobe Photoshop 7.0.1 C.S.2 software (San Jose, CA, USA) for scaling and adjusting the levels of brightness and contrast applied to the whole image. The selected micrographs display representative sections from each experimental group.

RESULTS

Clinical signs and survival

Following serial infections under the regimen of

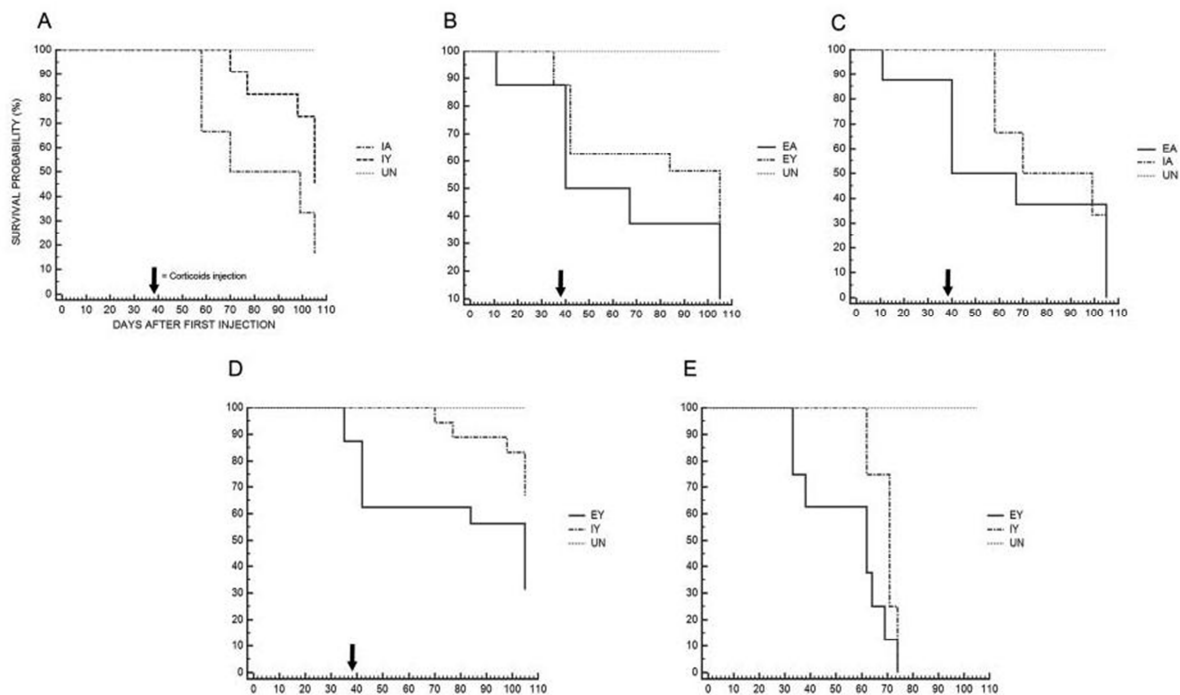


Fig. 2. Survival probability after multiple infections under the regimen of antibody-enhanced dengue disease in albino Swiss mice. Kaplan–Meier survival plots for control or infected aged (18 months, M) and young (9M) mice raised in enriched or impoverished environments. All animals from impoverished (IA, $n = 8$; IY, $n = 18$) and enriched (EA, $n = 8$; EY, $n = 16$) environments were administered equal volumes of serial i.p. inoculations of DENV3 (genotype III)-infected brain homogenate followed by DENV2 hyperimmune serum 24 h later. Note faster decrease of survival probability in the EE animals compared with IE mice and a higher mortality rate or disease signs in aged mice. **A)** IA vs IY, log-rank test, $p = 0.022$; **B)** EA vs EY, $p = 0.011$; **C)** EA vs IA, $p = 0.011$; **D)** A plateau in the survival probability following glucocorticoid injection (arrows) is apparent in all young but not aged experimental groups. All young animals that received glucocorticoids, EY vs IY, $p = 0.016$ (D) survived for a longer period than age-matched mice that did not receive them EY vs IY, $p = 0.002$ (E), and this effect was more intense in EE than in IE animals. EA: enriched aged; EY: enriched young; IY: impoverished young. UN: uninfected.

serial AED infections, EE young (EY) and aged (EA) animals showed earlier and more intense clinical signs including dyspnea, tremor, hunched posture, ruffled fur, immobility, preterminal paralysis, shock, and death compared to IE young (IY) and aged (IA) animals (see previously published video records of mice clinical signs after antibody-enhanced DENV multiple infections (11).

Fig. 2 illustrates a Kaplan–Meier analysis indicating significant differences in the survival probability curves of the experimental groups (Fig. 2A: IA vs IY, log-rank test, $p = 0.022$; 2B: EA vs EY, log-rank test, $p = 0.011$; 2C: EA vs IA, log-rank test, $p = 0.011$; 2D: EY vs IY log-rank test, $p = 0.016$)

and 100% of deaths in EA, 75% in IA, 44% in EY, and 17% in IY. Note that 100% of young animals (EY and IY) that did not receive glucocorticoids died or reduced burrowing to below 40%, earlier than all other groups with corticoids (Fig. 2E). Deaths in EY started earlier than in IY in the mice with no corticoids (EY vs IY log-rank test, $p = 0.0025$, Fig. 2E), and all animals of the uninfected group survived.

As compared to young animals from both enriched and impoverished environments, glucocorticoid injection (arrows in Fig. 2) had no significant effects in aged mice independent of the environment. Indeed the glucocorticoids appeared to stabilize the survival probability curve of young mice with earlier and

more intense effects in EE than IE mice (Fig. 2D, E).

Burrowing activity was followed until the 15th week post-injection (WPI). Compared to baseline, only aged IE mice showed significant changes in the amount of burrowed food after 9 WPI. (IA, *t*-test, $p = 0.05$; Fig. S1A).

Infected EE animals, independent of age, reduced burrowed food earlier (7 WPI) than the aged IE animals (9 WPI). After AED serial infection, at this time point, EA and EY mice showed a similar significant decrease in burrowed food (EA baseline = 100 ± 10.26 vs EA 7 WPI = $48.07 \pm 8.66\%$, $p = 0.014$; EY baseline = $100\% \pm 2.75$ vs EY 7 WPI = 38.07×9.46 , $p = 0.001$), with reductions of 51.93% and 61.93%, respectively (one-way ANOVA, Bonferroni *a priori* test, $p < 0.05$) whereas IA (baseline = $80.64 \times 7.16\%$ vs IA 9 WPI = $48.41 \pm 10.2\%$, $p = 0.05$) showed less reduction in burrowed food (32.23%); IY did not change burrowing activity ($p > 0.05$). These results indicate that aging and EE are associated with

more intense outcomes induced by the AED regimen of multiple infections in a murine model.

Pathological changes after antibody-enhanced DENV infection

Fig. 3 shows photomicrographs from representative DENV3 antigen immunolabeling to illustrate the distribution in the liver and lungs of aged and young mice from EE and IE. Systematic analysis of its distribution in different groups revealed that EE mice had a higher degree of viral antigen immunolabeling than IE animals, and sections from aged IE mice were less immunolabeled for viral antigens than all other groups. No viral antigenic immunolabeling was detected in the sections from control groups.

Fig. 4 illustrates viral antigen immunofluorescence in spleen and kidney. Less apparent differences between EE and IE animals were detected in these

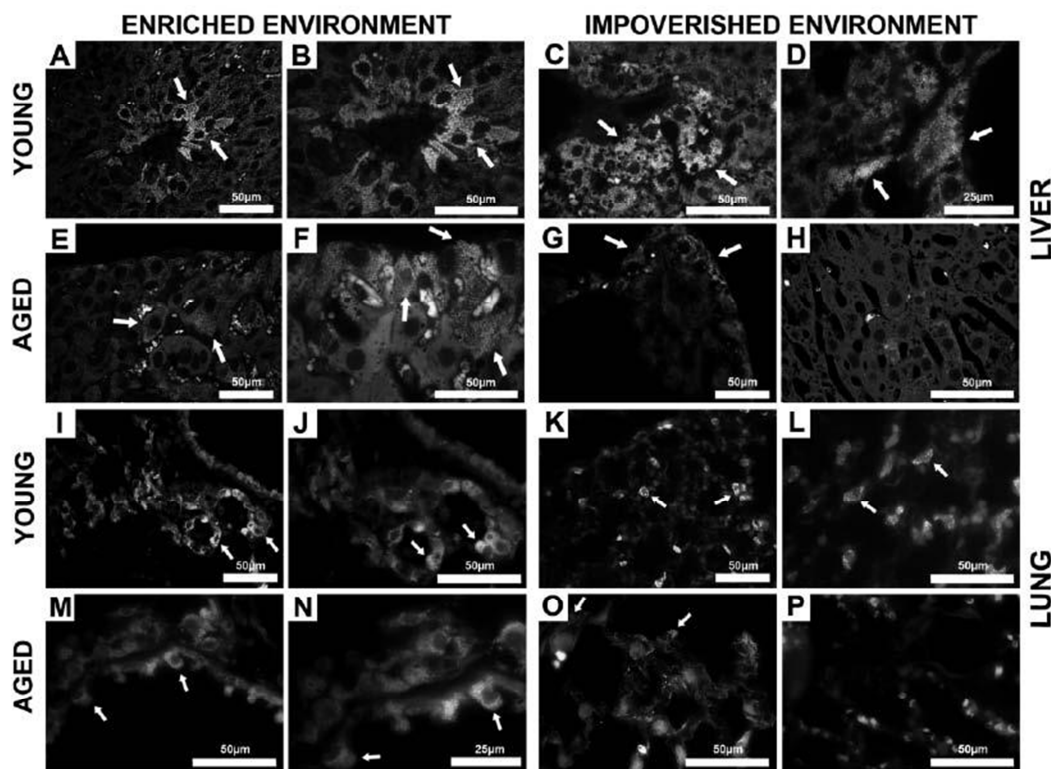


Fig. 3. DENV3 viral antigen immunolabeling in liver (A-G) and lung (I-O) sections from aged (2nd and 4th rows) and young (1st and 3rd rows) mice raised in enriched (left columns) and in impoverished (right columns) environments. Young and aged EE mice showed a higher degree of viral antigen immunolabeling than IE animals. The control uninfected groups (H and P) did not show viral antigen immunolabeling. Arrows point to immunopositive cells for DENV3 viral antigens.

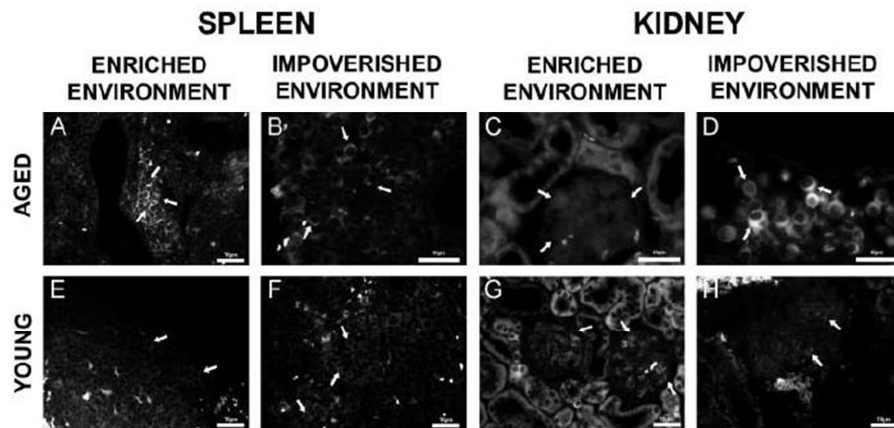


Fig. 4. DENV3 viral antigens immunofluorescence in spleen (A, B, E, F, left panel) and kidney (C, D, G, H, right panel) sections from aged and young mice raised in impoverished or enriched environments. Positive immunofluorescence for DENGUE virus antigens (arrows) is restricted to the cytoplasm and appears as a ring around the mononuclear cell nucleus. Note that the rounded nucleus of mononuclear cells both in spleen (A, B, E, F) and kidney (D, H) are not labeled for viral proteins. Viral antigens appear to be less frequent in the tubular epithelial cells than in endothelial-like cells of glomerular region (C, G) but more frequent in the inflammatory cells in renal interstitial tissue (D, H).

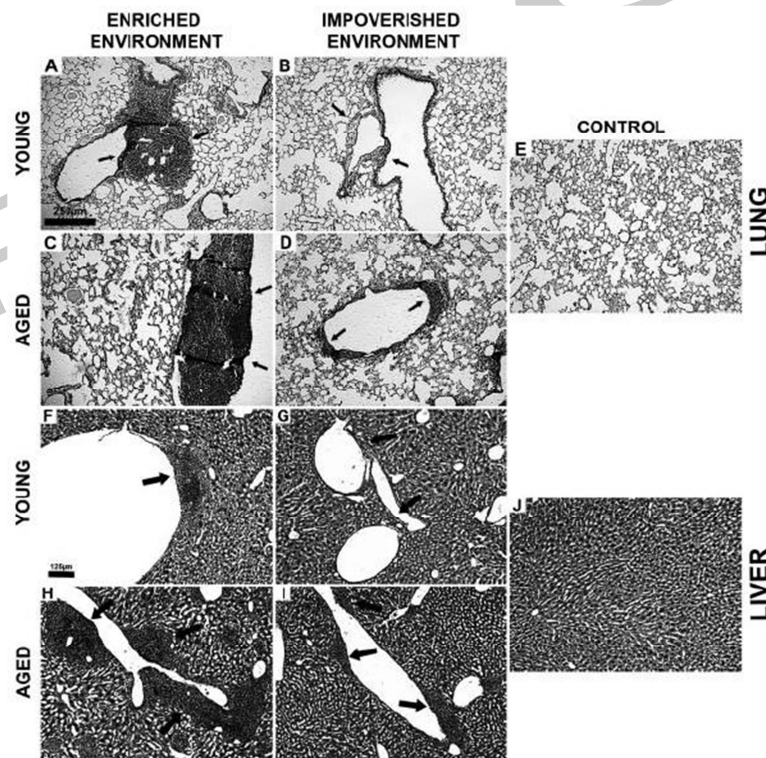


Fig. 5. Lung (A–E) and liver (F–J) pathology after antibody-enhanced dengue disease. Photomicrographs of hematoxylin-eosin-stained sections to illustrate pathological changes in the lungs of infected young (A, B) and aged (C, D) and control uninfected (E) mice. Note larger infiltrates of mononuclear cells (arrows) dominated by lymphocytes in mice from enriched environment. Aged mice also had larger infiltrates than young mice raised in the correspondent environments. Note in liver sections that the inflammatory mononuclear infiltration in the subendothelial space of peri-efferent veins was more intense in EE mice (F) compared to IE animals (G). Aged EE mice (H) when compared with all other groups had by far the largest mononuclear infiltration. Mononuclear infiltration was virtually absent in the uninfected control animals (J). Scale bar for all images: 125 μ m.

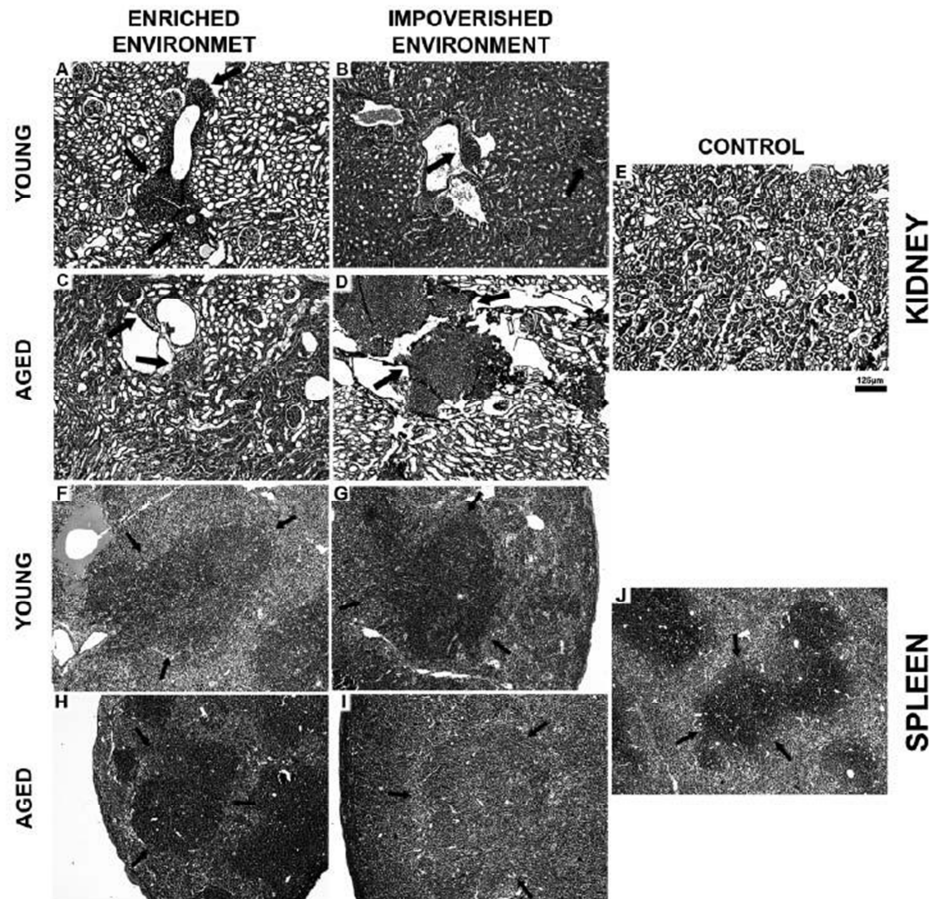


Fig. 6. Kidney (A–E) and spleen (F–J) pathology after antibody-enhanced dengue disease. Photomicrographs of hematoxylin–eosin-stained sections to illustrate mononuclear infiltrates in the kidneys of infected young (A, B) and aged (C, D) but not in control uninfected (E) mice. Photomicrographs of hematoxylin–eosin-stained sections to illustrate mononuclear hyperplasia in the spleen white pulp of infected young (F, G) and aged (H, I) but not in the control uninfected (J) mice. Although no correlations were found between age or environment with mononuclear infiltration in kidneys, or mononuclear hyperplasia in spleen, all kidney and spleen samples of infected mice showed mononuclear infiltration or hyperplasia respectively. Arrows point to mononuclear infiltrates in the kidney or mononuclear hyperplasia in the spleen white pulp of infected mice. Scale bar for all images: 125 μ m.

organs after immunofluorescence labeling. Viral antigen immunofluorescence is limited to the cytoplasm and appears as a ring around mononuclear cell nucleus. Immunofluorescent viral antigens seemed to be more frequent in the inflammatory cells in renal interstitial tissue and glomerular region (endothelial-like cells) than in the tubular epithelial cells.

Fig. 5 illustrates pathological features associated with antibody-enhanced dengue disease. Photomicrographs from lung and liver hematoxylin–eosin stained sections from infected animals were selected to show major pathological changes in

comparison with the control uninfected group. After AED infection, a systematic comparison between EE and IE aged and young animals showed a higher degree of inflammatory mononuclear infiltrates in the former than in the latter, as illustrated in lungs and liver. No infiltrates were detected in control groups.

Fig. 6 illustrates major pathological changes in kidneys and spleen of infected animals in comparison with the uninfected control group. Inflammatory mononuclear infiltrates were the major pathological finding in kidney sections from AED infected individuals, independent of age or environment

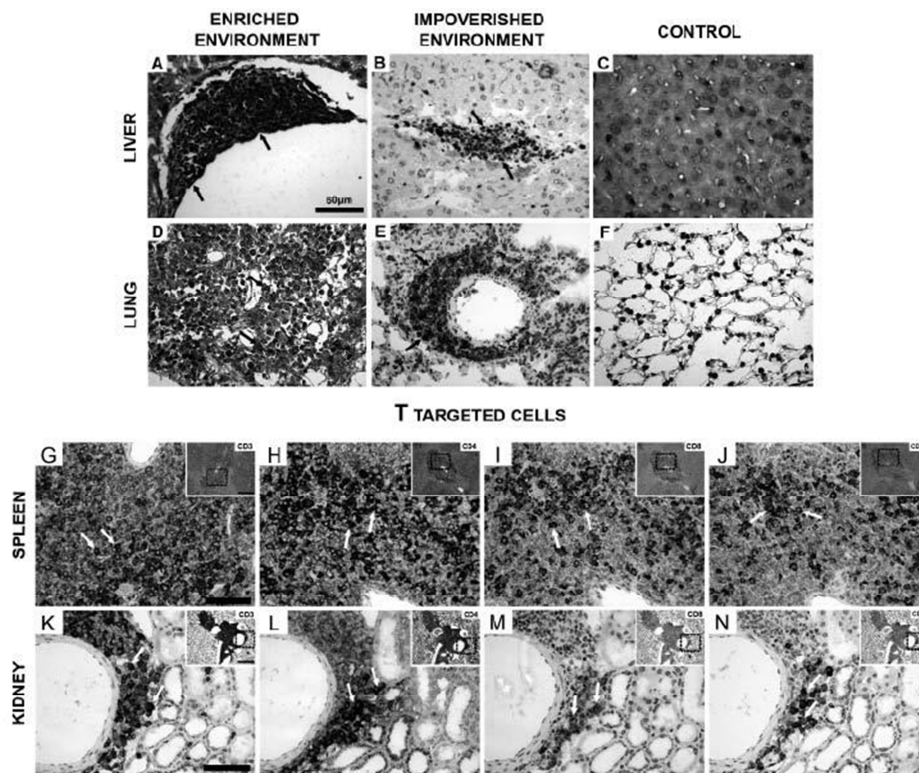


Fig. 7. T-lymphocyte photomicrographs from infiltrates in the liver, lung, and kidney and from hyperplasia in the spleen white pulp taken from infected aged mice. **A–F** Immunohistochemistry for T (CD3+) lymphocytes counterstained by Harry's hematoxylin in liver and lung sections. T-lymphocyte infiltration was detected in both livers (A, B) and lungs (D, E) from infected mice from enriched (A, D) and impoverished (B, E) environments but not in uninfected mice (C, F). Aged EE mice tended to show a higher degree of infiltration. **G–N** A sample of immunolabeled reacted sections from infected aged mice after CD3 (G, K), CD4 (H, L), CD8 (I, M), and CD20 (J, N) immunoreaction, counterstained with Harry's hematoxylin. Arrows point to immunolabeled cells. Top panels scale bar: 60 μ m. Bottom panels, scale bars: low-power images, scale bar = 125 μ m; high-power images, scale bar = 60 μ m.

where mice were raised. Similarly, splenic white pulp lymphoid hyperplasia was detected in the AED infected group, independent of age and environment.

Fig. 7 illustrates immunohistochemistry results for detection of T lymphocytes in aged mice from different environments. Compared to the IE groups, larger infiltrates with dominant T-lymphoid (CD-3 positive) cells were detected in liver, near the efferent perivein and in lungs, near the peribronchial spaces in EE animals. Fig. 7 also illustrates immunopositive T (CD-3, CD4, CD-8) and B (CD-20) lymphocytes in spleen and kidneys of aged infected mice. These pathological changes were virtually absent in the uninfected control group.

The presence of virus 24 h after the last DENV3 inoculation when clinical signs became apparent was indirectly detected and identified by RT-PCR using specific primers for the envelope (E) gene of DENV-3. PCR was performed using the SuperScript III Platinum SYBR Green One-step qRT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Low viral titers were detected at this time window, but the highest value for viral genome copies/ml was found in the liver of EA animals (10.9 copies/ml) compared with spleen (0.29 copies/ml), lungs (0.02 copies/ml), or brain (0.002 copies/ml). Although viral load at this time window was low and our sample reduced, quantitative analysis by RT-PCR showed that EA animals presented in both liver and lungs a higher number of viral genome copies/

ml than EY or IY animals.

DISCUSSION

In the present study, we tested the influences of aging and EE on dengue disease progression in a murine model of AED serial infections in adult female albino Swiss mice. We found that both young and aged EE infected mice showed more intense clinical symptoms and deaths than IE animals. In addition, these signs were associated with a higher degree of viral antigen immunolabeling and T lymphoid infiltration in liver, lungs, and kidneys and splenic white pulp hyperplasia dominated by T lymphocytes.

Under the regime of serial AED infection, a higher number of deaths occurred in EA animals compared with IA, EY, and IY mice. These results are in line with a previous report on elderly patients with secondary DENV infection (17). Taken together, our data suggest that after serial AED infections, environment and aging influences on disease progression might contribute to disease severity through an exacerbated inflammatory response. Indeed, EE enhances T-cell activity during viral infections (26), and dengue virus is associated with increasing frequencies of IFN- γ - and TNF- α -producing T cells after primary infection with all DENV serotypes and secondary infection enhancing these responses (18). In an earlier report (19), T-cell responses to sequential infections were measured after mouse immunization with different sequences of dengue virus serotypes and measurement of the frequency of peptide-specific T cells after infection. After heterologous secondary infection in BALB/c mice, the acute response was enhanced as compared with the acute response after primary infection (28). On the other hand, passive administration of anti-DENV antibodies against one dengue virus serotype followed 24 h later by inoculation of another serotype of dengue virus was sufficient to enhance dengue virus infection and disease in AG129 mice, representing the first *in vivo* model of antibody-enhanced lethal dengue disease (3).

Based on these previous findings, it is reasonable to suggest that an increased cytokine release in EE animals where we detected higher T-lymphocyte infiltration or hyperplasia compared with IE animals,

might be responsible for the differences in symptom severity and mortality. However, because we did not assess inflammatory mediators, it remains to be investigated whether increased cytokine production in EE animals contributes to differences in disease severity and mortality rates compared to IE animals. However, because we did not assess inflammatory mediators, it remains to be investigated whether increased cytokine production in EE animals contributes to differences in disease severity and mortality rates compared to IE animals.

Consistent with an inflammatory hypothesis, we also found in the current study an important coexistence of viral antigen immunolabeling and T-lymphoid infiltration around hepatic efferent veins, mononuclear infiltration with dominant T lymphocytes in the peri-bronchial space, in the interstitial renal tissue, and important lymphoid hyperplasia of spleen white pulp.

In addition, our results are in line with previous reports of DENV infection in other murine models (6) suggesting that the liver, lungs, kidneys and spleen are important targets for secondary DENV infection induced by the combination of anti-DENV2 antibody and the serotype 3 (genotype III) dengue virus.

Antibody-enhanced dengue disease and corticoids

In the present study, delayed glucocorticoid injection stabilized survival curves of young but not aged infected mice. Indeed, aggravated outcomes were reduced after a single corticoid injection, suggesting that an anti-inflammatory effect may be responsible, as previously described in young mice (11), humans (20-22), and *in vitro* (23). Because corticosteroids reduce T-lymphocyte proliferation (24), a relative decrease in the number of T lymphocytes during this remission period following glucocorticoid injection could explain the reduction in the percentage of deaths and disease symptoms in young animals. A previous report demonstrated that dexamethasone induces complete inhibition of cytokine production after a peripheral challenge with LPS, reducing the inflammatory response (12). Further supportive evidence is that delayed but not early glucocorticoid treatment protects the host, increases survival, and decreases cerebral damage during experimental herpes simplex virus

encephalitis in mice (25).

Glucocorticoids act via the T-cell intracellular glucocorticoid receptor and may negatively regulate the expression of numerous genes associated with pro-inflammatory cytokine signaling (26). Although we have no explanation for reduced glucocorticoid effects in aged infected mice, a reduction of low-affinity glucocorticoid receptors has been described in aged rats (27), which may reduce glucocorticoid anti-inflammatory effects under the chronic stress condition experienced by infected animals. Because we did not assess glucocorticoid receptors in the present work and do not know the systemic distribution of those receptors in aged mice, this question deserves further investigation.

Environmental enrichment and dengue disease

Another aspect to be considered is that aged EE mice compared to young EE animals showed higher mortality after antibody-enhanced dengue disease. These results mimic previous descriptions of secondary infections in aged mice (28, 29) and humans (30). A poor proliferative potential of memory T cells and altered memory CD8 T-cell differentiation have been suggested to explain age-related defects in antiviral immunity. However, in the present report, stronger inflammatory hyperplasia was detected in the lungs of aged EE animals compared with young EE mice. Liver and kidney pathological changes similarly revealed that T-lymphocyte infiltration appeared more intense in old EE than young EE mice but was significantly reduced in young IE animals.

On the other hand, our findings suggest striking differences between infected and control animals in the spleen white pulp, independent of age and environment, with a significant lymphoid hyperplasia in infected animals. Aging and a sedentary lifestyle have been associated with a decline in the normal functioning of the immune system that may contribute to the increased outcomes of infection seen in the elderly. Regular exercise, as observed in EE mice, has been associated with lower numbers of exhausted/senescent T cells, increased T-cell proliferative capacity, lower circulatory levels of inflammatory cytokines, increased neutrophil phagocytic activity, lowered inflammatory response to bacterial challenge, and greater NK-cell cytotoxic activity, indicating that habitual exercise can regulate the immune

system and delay the onset of immunosenescence; for a recent review, see (31). Because it has been suggested that antibody-enhanced dengue disease is associated with an enhanced inflammatory host response in outbred mice (32), and exercised aged EE mice in the current work showed more intense clinical outcomes and T-lymphocyte infiltration than age-matched IE animals, we suggest that a higher degree of inflammatory response occurs in EE. Although our descriptive immunopathology data in outbred mice in a previous study (11) and in the present report are coherent with this hypothesis, the molecular mechanisms to explain differential pathological inflammatory response in different tissues in mice after antibody-enhanced DENV3 disease remain to be investigated.

The results add evidence to the idea of a T-cell-mediated exacerbated inflammatory response and antibody-enhanced dengue disease in correlation with disease severity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study had financial support from CNPq (grant no. 300460/2005-8, 301955/2007-7, and 471444/2006-5), INCT-FHV/CNPq/CAPES/FAPESP (grant no. 573739/2008-0), FINEP/FADESP (grant no. 01.04.0043.00) and PROPESP-UFPA-FADESP. Instituto Nacional de Febres Hemorrágicas Virais (INCT-FHV/CNPq) supported SMMK, EVPS, JAPD, MRTN, CWPD and PFCV. Instituto Brasileiro de Neurociências – IBNnet/ FINEP supported CWPD.

REFERENCES

1. Rothman AL. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 338:83-98.
2. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003; 60:421-67.
3. Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog* 2010; 6:e1000790.

4. Friberg H, Bashyam H, Toyosaki-Maeda T, et al. Cross-reactivity and expansion of dengue-specific T cells during acute primary and secondary infections in humans. *Sci Rep* 2011; 1:51.
5. Boonnak K, Dambach KM, Donofrio GC, Tassaneetrithep B, Marovich MA. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol* 2011; 85:1671-83.
6. Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses* 2012; 4:62-82.
7. Gubler DJ, Meltzer M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res* 1999; 53:35-70.
8. Suaya JA, Shepard DS, Siqueira JB, et al. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80:846-55.
9. Thomas SJ, Strickman D, Vaughn DW. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv Virus Res* 2003; 61:235-89.
10. Gibbons RV, Kalanarooj S, Jarman RG, et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77:910-3.
11. Diniz DG, Fôro CA, Turiel MC, et al. Environmental influences on antibody-enhanced dengue disease outcomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107:1021-9.
12. Teeling JL, Cunningham C, Newman TA, Perry VH. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. *Brain Behav Immun* 2010; 24:409-19.
13. Simpson RJ, Guy K. Coupling aging immunity with a sedentary lifestyle: has the damage already been done?--a mini-review. *Gerontology* 2010; 56:449-58.
14. Guzmán MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis* 2002; 6:118-24.
15. Cunningham C, Campion S, Teeling J, Felton L, Perry VH. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun* 2007; 21:490-502.
16. de Sousa AA, Reis R, Bento-Torres J, et al. Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. *PLoS One* 2011; 6:e15597.
17. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:S7-16.
18. Beaumier CM, Jaiswal S, West KY, Friberg H, Mathew A, Rothman AL. Differential *in vivo* clearance and response to secondary heterologous infections by H2(b)-restricted dengue virus-specific CD8+ T cells. *Viral Immunol* 2010; 23:477-85.
19. Beaumier CM, Mathew A, Bashyam HS, Rothman AL. Cross-reactive memory CD8(+) T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *J Infect Dis* 2008; 197:608-17.
20. Chang PE, Cheng CL, Asok K, Fong KY, Chee SP, Tan CK. Visual disturbances in dengue fever: an answer at last? *Singapore Med J* 2007; 48:e71-3.
21. Kularatne SA, Walathara C, Mahindawansa SI, Wijesinghe S, Pathirage MM, Kumarasiri PV, Dissanayake AM. Efficacy of low dose dexamethasone in severe thrombocytopenia caused by dengue fever: a placebo controlled study. *Postgrad Med J* 2009; 85:525-9.
22. Premaratna R, Rodrigo KM, Anuratha A, de Alwis VK, Perera UD, de Silva HJ. Repeated dengue shock syndrome and 'dengue myocarditis' responding dramatically to a single dose of methyl prednisolone. *Int J Infect Dis* 2012; 16:e565-9.
23. Reis SR, Sampaio AL, Henriques M, Gandini M, Azeredo EL, Kubelka CF. An *in vitro* model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102:983-90.
24. Lu YS, Pu LY, Li XC, Wang XH. Methylprednisolone inhibits activated CD4+ T cell survival promoted by toll-like receptor ligands. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9:376-83.
25. Sergerie Y, Boivin G, Gosselin D, Rivest S. Delayed but not early glucocorticoid treatment protects

- the host during experimental herpes simplex virus encephalitis in mice. *J Infect Dis* 2007; 195:817-25.
26. Van Laethem F, Baus E, Smyth LA, Andris F, Bex F, Urbain J, Kioussis D, Leo O. Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling. *J Exp Med* 2001; 193:803-14.
 27. Lee SY, Hwang YK, Yun HS, Han JS. Decreased levels of nuclear glucocorticoid receptor protein in the hippocampus of aged Long-Evans rats with cognitive impairment. *Brain Res* 2012; 1478:48-54.
 28. Decman V, Laidlaw BJ, Dimenna LJ, Abdulla S, Mozdzanowska K, Erikson J, Ertl HC, Wherry EJ. Cell-intrinsic defects in the proliferative response of antiviral memory CD8 T cells in aged mice upon secondary infection. *J Immunol* 2010; 184:5151-9.
 29. Jiang J, Bennett AJ, Fisher E, Williams-Bey Y, Shen H, Murasko DM. Limited expansion of virus-specific CD8 T cells in the aged environment. *Mech Ageing Dev* 2009; 130:713-21.
 30. Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis* 2000; 31:578-85.
 31. Simpson RJ, Lowder TW, Spielmann G, Bigley AB, Lavoy EC, Kunz H. Exercise and the aging immune system. *Ageing Res Rev* 2012; 11:404-20.
 32. Falconar AK, Martinez F. The NS1 glycoprotein can generate dramatic antibody-enhanced dengue viral replication in normal out-bred mice resulting in lethal multi-organ disease. *PLoS One* 2011; 6:e21024.

PROOF



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará analisou o projeto de pesquisa intitulado **“Doenças Neurodegenerativas Crônicas na Amazônia Brasileira: o impacto da infecção e da inatividade sobre o curso temporal das demências”**, protocolo nº **1701/05** sob a responsabilidade dos pesquisadores *Benedito Paulo Bezerra e Pedro Fernando da Costa Vasconcelos* e coordenação do *Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz*, obtendo APROVAÇÃO na reunião do dia 12/09/2005, por estar de acordo com a Resolução nº 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde do Brasil.

Belém, 12 de setembro de 2005


Dr. Eduardo Leitão Maia

COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / HUJBB/UFGA