

Prof. Dra. Danielle da Gloria de Souza



## Mediadores inflamatórios na Dengue




Departamento de Microbiologia  
ICB - UFMG



## Introdução

- 2.5 bilhões de pessoas sob risco de infecção (100 países);
- Mais de 50 milhões de infecções anuais;
- 500 000 casos de FHD e 22 000 mortes.



WHO web site



Mackenzie et al. Nat. Med. 2004

## Introdução

- 1980 a 2006: cerca de 4 milhões de casos;

BRASIL - 2001 (1)								FHD (2)	
REGIÃO	JAN	FEV	MAR	ABR	MAIO	M. Jgn. (3)	TOTAL	CASOS	ÓBITOS
BRASIL	48.747	73.751	83.424	39.370	999	562	246.833	288	38

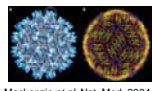







## Introdução


- Dengue virus:
  - Flaviviridae;
  - Den 1-4;
  - RNA de fita simples de sentido positivo;
  - Transmissão por mosquitos:
    - Aedes aegypti* and *A. albopictus*.




Mackenzie et al. Nat. Med. 2004



*Aedes aegypti*

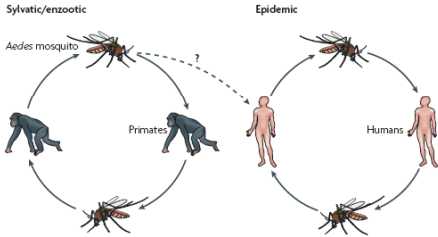


*Aedes albopictus*



Alvarez et al. Novartis. Found. Symp. 2006

## Introdução



Sylvatic/enzootic      Epidemic

Aedes mosquito      Aedes mosquito

Primates      Humans

Whitehead et al. Nat. Rev. Microbiol. 2007

## Introdução

- Tropismo celular:
  - Linhagem fagocítica mononuclear (monócitos, macrófagos, e células dendríticas);
  - Linfócitos B, linfócitos T, células NK, células endoteliais, hepatócitos, células nervosas.

## Introdução

- Amplo espectro de manifestações:
  - Manifestações sub-clínicas;
  - Doença febril leve;
  - Febre do Dengue (clássica) (FD);
  - Febre hemorrágica do dengue (FHD);

## Introdução

- Fatores de risco para FHD:
  - Linhagem e sorotipo virais, tamanho do inóculo;
  - Perfis genético e imune e idade do hospedeiro;
  - Doenças concomitantes;
  - Infecção anterior com sorotipo diferente.

## Introdução

- Patogênese:
  - Ativação de células endoteliais: aumento da permeabilidade vascular, hemoconcentração, hipotensão e choque;
  - Ativação leucocitária: leucitose ou leucopenia;
  - Agregação plaquetária: plaquetopenia e hemorragia.

**Não há tratamentos nem vacinas disponíveis.**

## Introdução

- Pouco conhecimento sobre a patogênese:
  - Dados clínicos;
  - Estudos *in vitro*;
  - Modelos animais inapropriados:
    - idade (poucos dias de vida);
    - focados na letalidade e não em manifestações clínicas;
    - Afetam predominantemente infecção do SNC;
    - Poucas alterações sistêmicas, como na doença humana.

Inbred laboratory strains	Knockout strains	Humanized SCID
Strain: C57BL/6J (B6) Method: Intranasal injection of mouse adapted virus. Effect: Liver damage and some thrombocytopenia, death by sepsis.	Strain: C57BL/6J Method: Intranasal or intraperitoneal injection of cell culture produced or mouse adapted virus. Effect: Sepsis, death.	Strain: NSG, Rag1 <sup>-/-</sup> , Rag2 <sup>-/-</sup> , CD45 <sup>-/-</sup> Method: Intranasal, intraperitoneal, or intracerebral injection of cell culture produced virus. Effect: Thrombocytopenia, increased haemorrhagic diathesis, death.

Charlier et al. *Novartis Found Symp.* 2006


## Introdução

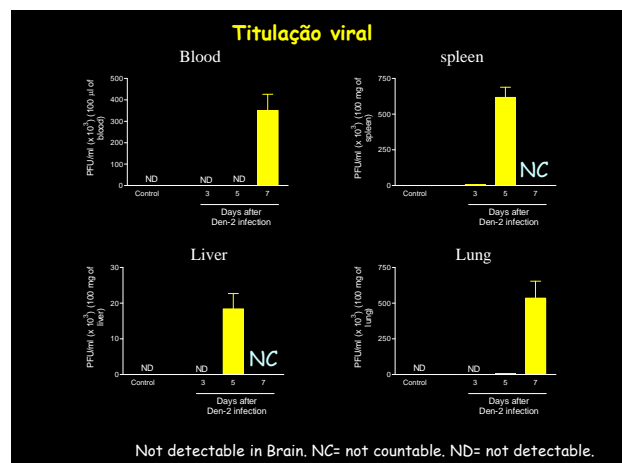
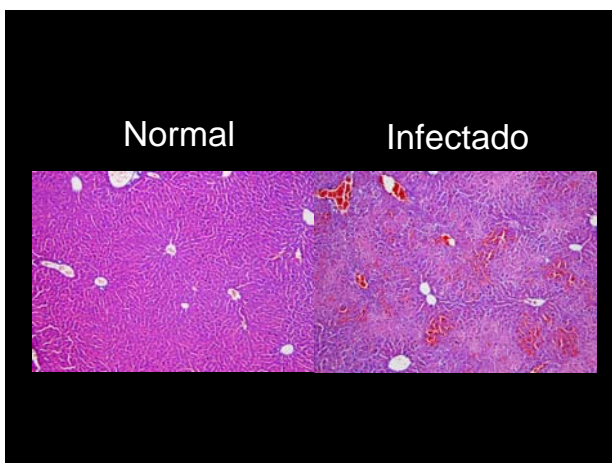
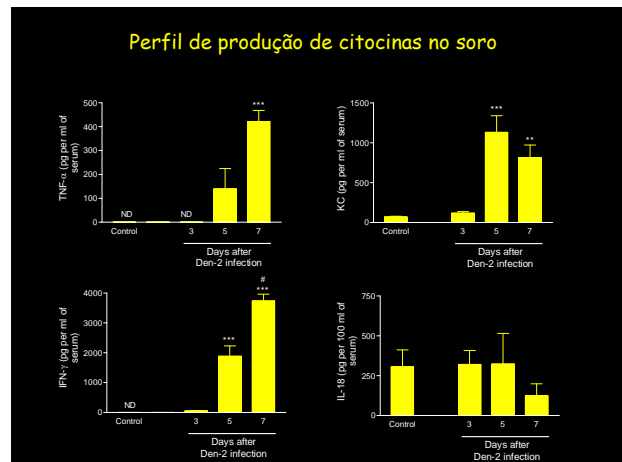
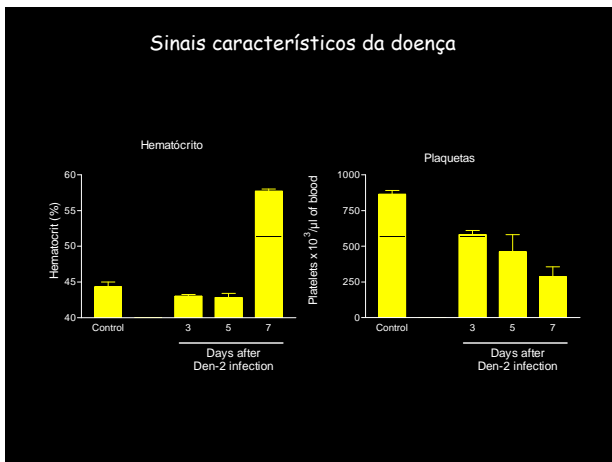
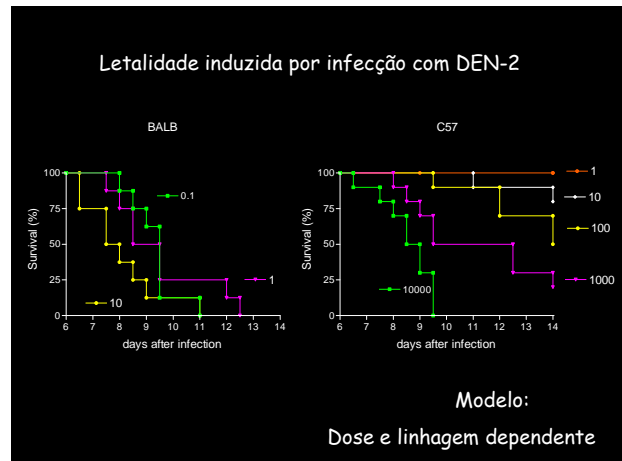
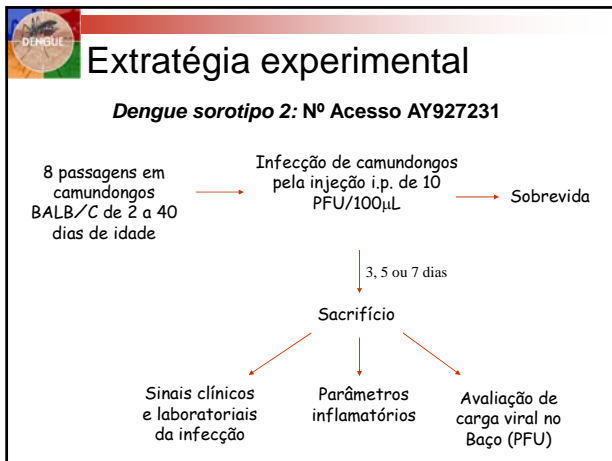
- FHD (lesão endotelial):
  - Anticorpos de reatividade cruzada;
  - Citocinas:
    - TNF- $\alpha$ ;
    - IL-6;
    - IL-8;
    - IL-10;
    - IFN- $\gamma$ .
  - PAF

## Hipótese de trabalho

Desenvolvimento de um modelo experimental de dengue nós permitirá o entendimento de mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese da doença

- Estratégias vacinais
- Outras possíveis estratégias enfocando na resposta do hospedeiro

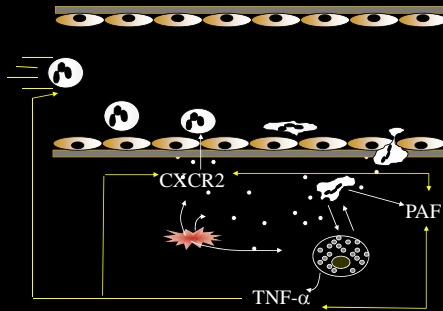
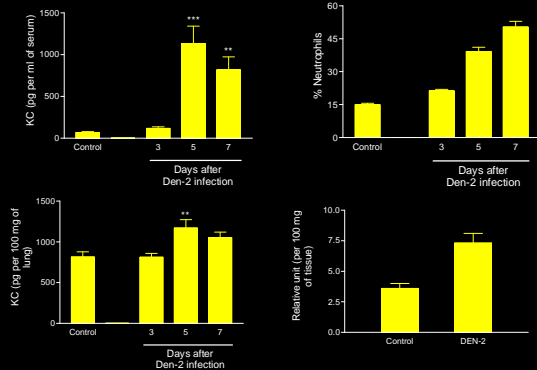
  
**Resposta inflamatória**



### Modelo experimental de Dengue

- Letalidade dependente de dose e linhagem.
- doença mais sistêmica que localizada com
  - leucocitose
  - Plaquetopenia
  - Hemoconcentração
- aumento de citocinas na circulação
- aumento de permeabilidade vascular

### Quimiocinas CXCR2 x neutrófilo



### PAF (Platelet-activation factor)

A administração de PAF induz:

Aumento de permeabilidade vascular

Recrutamento e ativação de leucócitos → leucocitose e/ou leucopenia

Ativação e agregação plaquetária → trombocitopenia e sangramento

Hipotensão

### PAF e Dengue (formas graves)

Aumento de permeabilidade vascular

Recrutamento e ativação de leucócitos → leucocitose e/ou leucopenia

Ativação e agregação plaquetária → trombocitopenia e sangramento

Hipotensão

### Platelet-Activating Factor

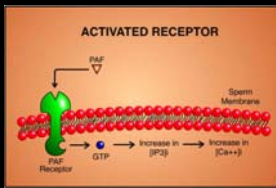
Platelet-activating factor (PAF) or 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine is an ether analogue of [phosphatidylcholine](#)

- PAF é sintetizado por vários tipos celulares

- Não é pré estocado – necessita de estímulo para ser formado;



PAF é liberado por leucócitos e células endoteliais



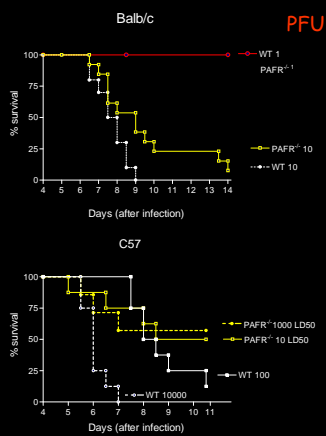
Seu receptor é expresso em leucócitos, plaquetas e células endoteliais.  
Receptor nuclear



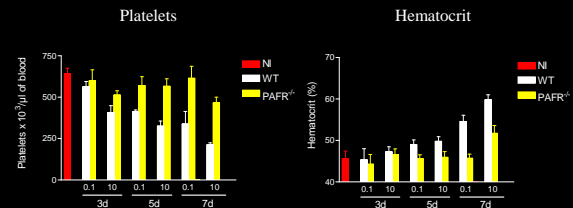
Para avaliar o papel do PAF:

- PAFR-deficient mice;
- PAFR antagonists (mostly developed for asthma/allergy) (including UK-74,505);

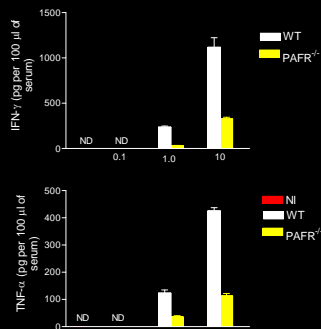
PAFR<sup>-/-</sup> são menos suscetíveis a infecção por DEN-2.  
Lethalidade



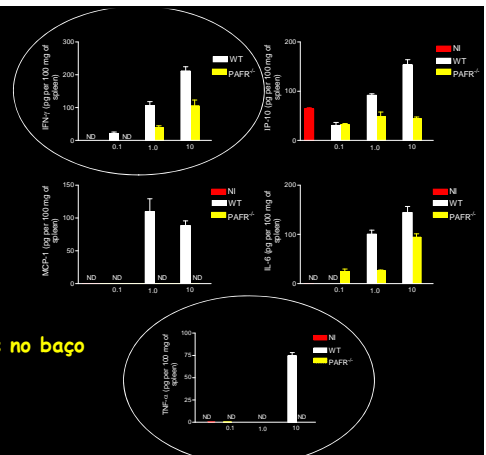
Sinais clínicos

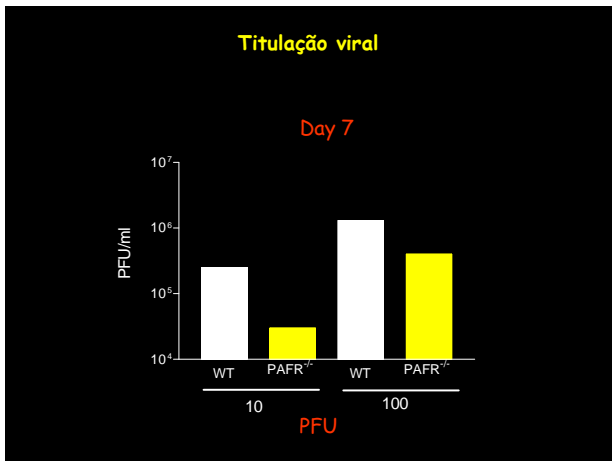


Citocinas no soro



Citocinas no baço





- Animais deficientes no receptor de PAF:**
- atraso da letalidade
  - menor gravidade da doença
  - menor resposta inflamatória sistêmica
  - menor carga viral sistêmica
- Antagonista de PAF???**  
**UK-74,505**

### UK-74,505 (modipafant)

Other compounds have been tested in humans BN52021, WEB2086

Parry MJ, Alabaster VA, Cheeseman HE, Cooper K, deSouza RN, Keir RF. Pharmacological profile of UK-74,505, a novel and selective PAF antagonist with potent and prolonged oral activity. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1994 Sep;10(3):251-68.

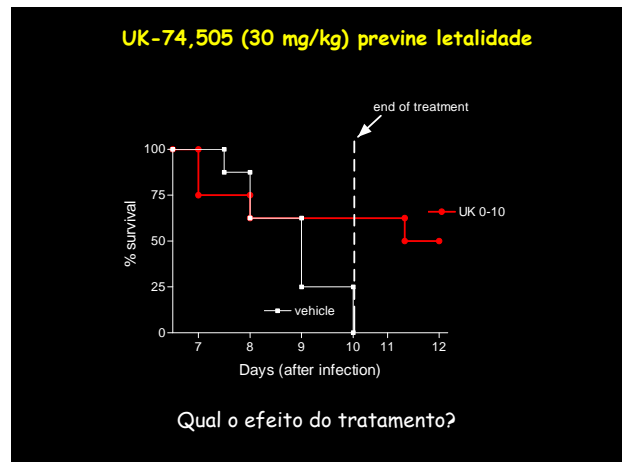
UK74,505 is a potent, selective, long-acting irreversible PAF antagonist.

Jezequel SG, Uden S, Wastall P. Modipafant, a new PAF antagonist: pharmacokinetics and disposition in rat, dog and man. *Xenobiotica.* 1996 Sep;26(9):963-75.

The elimination of modipafant is characterized by short half-life (mean values for t<sub>1/2</sub> range from 1 to 3 h). However, the nature of the receptor kinetics of modipafant (slow offset) means that the drug shows a long duration of action in spite of short pharmacokinetics at pharmacologically relevant doses.

Kuitert LM, et al. Effect of a novel potent platelet-activating factor antagonist, modipafant, in clinical asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 May;151(5):1331-5.

59 patients with asthma took modipafant (one 50 mg capsule twice daily), no effect in chronic asthma.



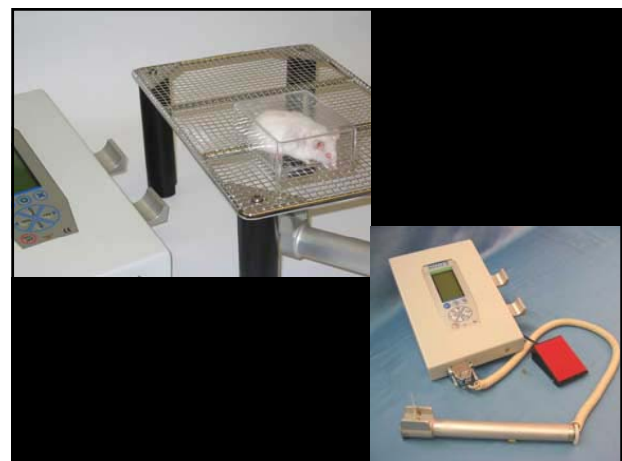
Alguns dos sintomas clínicos mais comumente observados incluem:

Febre e dor (corpo, cabeça - "break-bone disease")

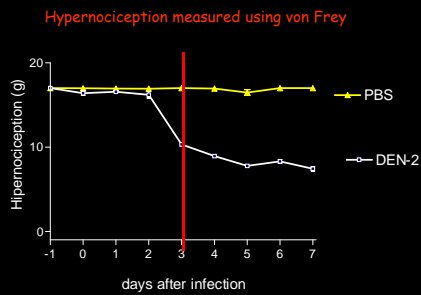
Há febre após infecção?

Não detectamos em nosso modelo.

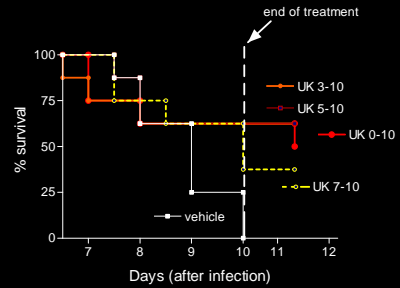
Há dor após infecção?



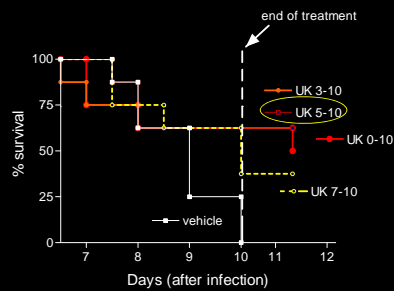
**Den-02 induz nocicepção após 3 dias de infecção.**



**Prevention of lethality occurs even if start of treatment is delayed.**

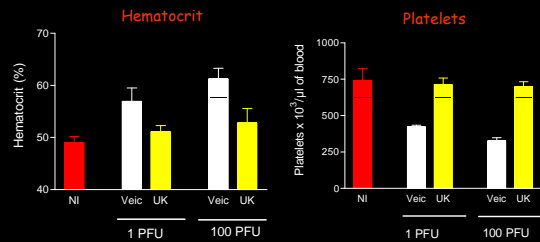


**UK-74,505 - 5-7 days, 30 mg/kg, BID**  
**Choice of treatment to evaluate effects of UK-74,505 on clinical disease.**



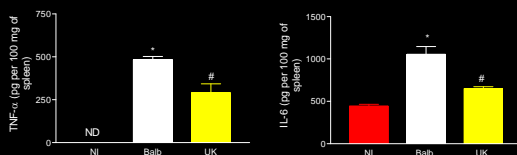
**Antagonista de PAF previne aparecimento de sinais clínicos induzidos por DEN-2**

treatment started on day 5 - parameters evaluated at day 7.



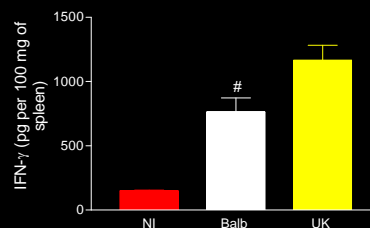
**Antagonista de PAF previne aumento da concentração de citocinas**

treatment started on day 5 - parameters evaluated at day 7.

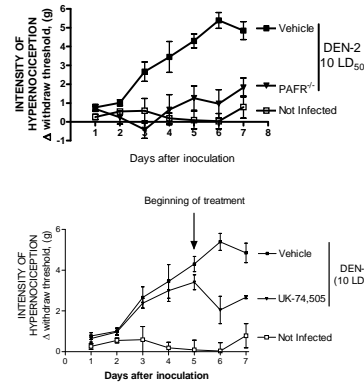
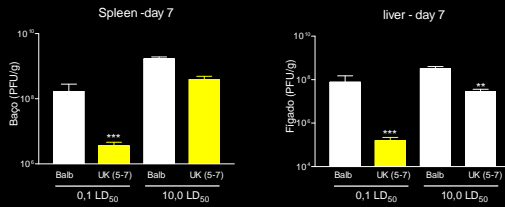


**Sem, entretanto, inibir concentração de IFN-γ**

treatment started on day 5 - parameters evaluated at day 7.



**Titulo viral**

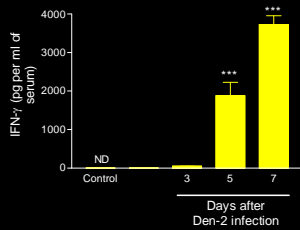
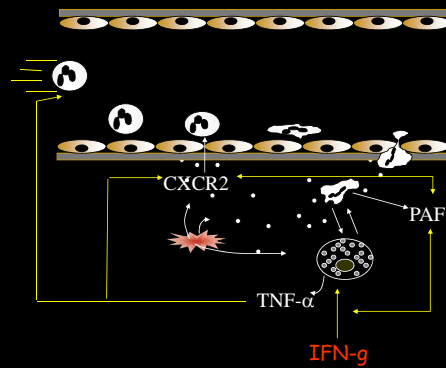


hipernociceção

Antagonista de PAFR pode ser proposto como uma nova terapia para o tratamento de dengue.

UK 74,505 já foi testado em humanos e possui farmacocinética e farmacodinâmica bem estabelecido

Estudo clinico??

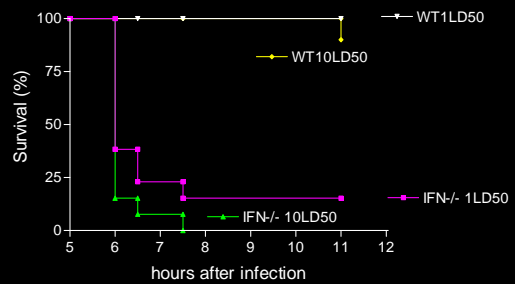


**IFN-γ**

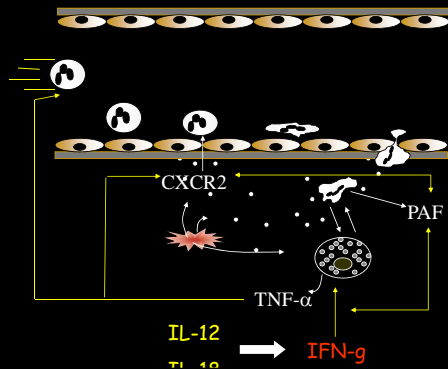
Possui importante papel na resposta inflamatória e imune, especialmente resposta Th1

Papel importante no controle de infecções virais

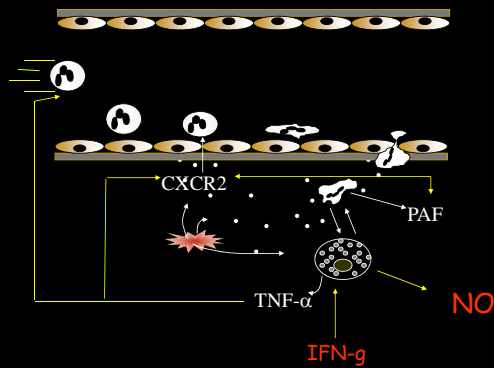
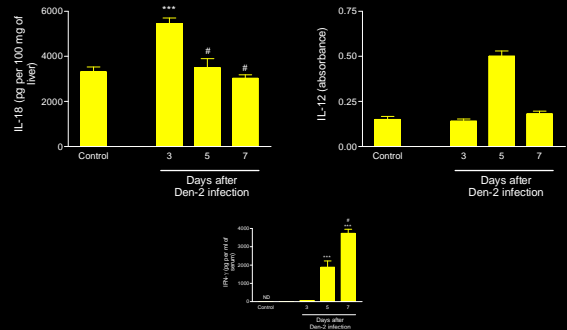
**IFN-γ<sup>-/-</sup> x WT**



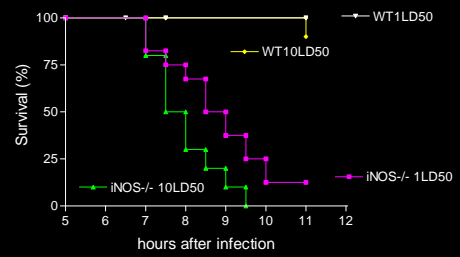
Em nosso modelo quais citocinas modulam a produção de IFN- $\gamma$



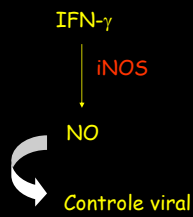
Após infecção com DEN-2 há uma produção inicial de IL-18 e IL-12



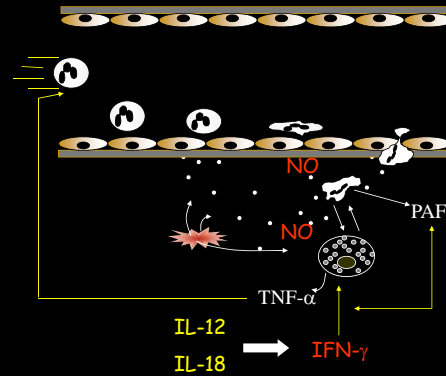
iNOS  $-/-$  x WT



IL-12 e/ou IL-18



IL-12/18-induced IFN- $\gamma$  acting via NO  $\rightarrow$  Role in protection  
Production of PAF and activation of PAFR  $\rightarrow$  severe disease



## Dengue group

### ICB/UFMG

- Prof. Mauro Martins Teixeira
- Dra. Lirlandia Sousa
- Flavio Amaral
- Caio Fagundes
- Patricia Soares de Souza
- Rafael Soares de Souza
- Daniel Cisalpino

### COLABORATION:

George Ignatyev  
Alena Atrasheuskaya  
Vector Institute, Russia

Erna Kroon, ICB/UFMG

