

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DENGUE E IMUNOLOGIA INATA:  
ESTUDO DOS FATORES ANTIVIRAIS E CITOTÓXICOS  
EM CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMACITOIDES E CÉLULAS NK  
DURANTE INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE

MARIANA GANDINI

Rio de Janeiro  
Junho de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*MARIANA GANDINI*

Dengue e Imunologia Inata: estudo dos fatores antivirais e citotóxicos em células dendríticas plasmacitoides e células NK durante a infecção pelo vírus Dengue

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Ciências

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>.Dra. Claire Fernandes Kubelka

**Co-orientador:** Dr. Jean-Philippe Herbeuval (período sanduíche)

**Colaboração:** Dra. Elzinandes Leal de Azeredo

**RIO DE JANEIRO**

**Junho de 2014**

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

G195 Gandini, Mariana

Dengue e imunologia inata: estudo dos fatores antivirais e citotóxicos em células dendríticas plasmacitoides e células NK durante a infecção pelo vírus dengue / Mariana Gandini. – Rio de Janeiro, 2014.

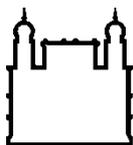
xix, 207 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 140-165

1. Vírus dengue. 2. Imunologia inata. 3. Células dendríticas plasmacitoides. 4. Células natural killer. 5. Citocinas. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

AUTOR: Mariana Gandini

### **DENGUE E IMUNOLOGIA INATA: ESTUDO DOS FATORES ANTIVIRAIS E CITOTÓXICOS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMACITOIDES E CÉLULAS NK DURANTE INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE**

**ORIENTADORA : Prof. Dra. Claire Fernandes Kubelka**

**Aprovada em: 30/06/2014**

#### **EXAMINADORES**

**Prof. Dra. Luciana Barros de Arruda - Presidente**

(Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes - UFRJ)

**Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza**

(Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

**Prof. Dra. Carmem Beatriz W. Giacoia Gripp**

(Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

#### **SUPLENTE**

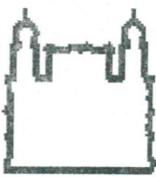
**Prof. Dr. Flávio Alves Lara**

(Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

**Prof. Dra. Dilvani Oliveira Santos**

(Instituto de Biologia - UFF)

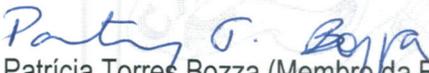
Rio de Janeiro, 30 de junho de 2014



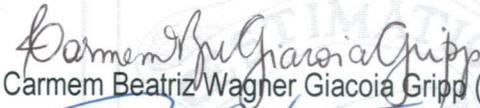
Ata da defesa da tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Mariana Gandini**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Claire Fernandes Kubelka. Ao trigésimo dia do mês de junho de dois mil e quatorze, realizou-se às treze horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Dengue e Imunologia inata: Estudo dos fatos antivirais e citotóxicos em células Dendríticas Plasmacitoides e células NK durante infecção pelo vírus Dengue”** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa Patogênese das Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Luciana Barros de Arruda – UFRJ/RJ (presidente), Dr<sup>a</sup>. Patrícia Torres Bozza – IOC/Fiocruz e Dr<sup>a</sup>. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp – IOC/Fiocruz; e como suplentes: Dr. Flavio Alves Lara – IOC/Fiocruz e Dr<sup>a</sup> Dilvani Oliveira Santos - UFF/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de **Doutora em Ciências** está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 30 de junho de 2014.



Dr<sup>a</sup>. Luciana Barros de Arruda (Presidente da Banca):



Dr<sup>a</sup>. Patrícia Torres Bozza (Membro da Banca):



Dr<sup>a</sup>. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp (Membro da Banca):



Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenação do Programa):

Dedico esta tese a todos aqueles me incentivaram a não perder o foco no árduo caminho da carreira acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

---

Aos pacientes e indivíduos saudáveis que gentilmente doaram as amostras que utilizamos neste trabalho. Obrigada pela generosa contribuição na construção do pensamento científico!

Aos meus muitos companheiros da estrada da vida: minha família, meus amigos e meu amor. Vocês são minha rocha, porque ninguém faz coisa alguma sozinho. Obrigada por serem pacientes nos meus piores momentos e presentes constantemente nas alegrias.

À Dra. Claire Kubelka, minha orientadora nesta tese e mentora da minha formação científica. Obrigada por ter acreditado no meu potencial, sempre me dando as oportunidades, confiando no meu trabalho.

Ao Dr. Jean-Philippe Herbeuval, meu orientador do período sanduíche. Agradeço profundamente a oportunidade de trabalho e sua valiosa contribuição lapidando meu pensamento científico.

Às Doutoras Naide Azeredo, Luzia Pinto, Gladys Corrêa e Fabienne Paiva. Muito obrigada pelas enriquecedoras discussões científicas que foram valiosas para o desenvolvimento dessa tese.

À toda equipe do laboratório de Imunologia Viral. Obrigada pela colaboração durante os intermináveis experimentos e análises.

Aos médicos e aos profissionais de saúde do Hospital Dia em Mato Grosso do Sul e do Centro de Referência de Dengue em Campos dos Goytacazes.

Aos membros da coordenação da pós-graduação em Biologia Parasitária. Agradeço aos inúmeros financiamentos que possibilitaram a execução dessa tese.

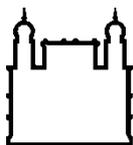
Aos integrantes da banca examinadora. Obrigada por gentilmente aceitarem nosso convite.

Aos órgãos financiadores no Brasil, CNPQ, CAPES, FAPERJ, FIOCRUZ e na França, CNRS e COFECUB.

Aos cidadãos brasileiros. Espero poder um dia retribuir todo investimento feito em mim, no desenvolvimento da educação e da ciência do nosso país.

*“Vem que o sol raiou.  
Os jardins estão florindo.  
Tudo faz pressentimento  
Que esse é o tempo ansiado de ser ter  
felicidade.”*

Elton Medeiros e Hermínio de Carvalho



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

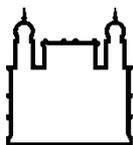
### DENGUE E IMUNOLOGIA INATA: ESTUDO DOS FATORES ANTIVIRAIS E CITOTÓXICOS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMACITOIDES E CÉLULAS NK DURANTE INFECÇÃO PELO VÍRUS DENGUE

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Mariana Gandini

O vírus dengue é um flavivírus causador de síndrome febril hemorrágica, sendo alguns casos graves evidenciados pelo acúmulo de plasma nas cavidades. Sugere-se que a intensa replicação viral na fase aguda resultaria na intensa produção de mediadores inflamatórios, levando ao extravasamento plasmático. A imunidade inata é uma importante barreira na limitação da dispersão viral. As células dendríticas plasmacitoides (PDCs) e as células NK são fundamentais durante a fase inicial das infecções por suas características antivirais e citotóxicas contra células infectadas. O fenótipo “Killer” das PDCs (IKPDCs) resultaria da ativação viral e é caracterizado pela expressão membranar do ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) e pela produção de interferons do tipo I. As células NK podem ser diretamente ativadas reconhecendo as células alvo ou, indiretamente ativadas pelas citocinas (como os interferons) tornando-se citotóxica, expressando TRAIL membranar. Apesar do papel antiviral, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação dessas populações celulares durante a febre do dengue (FD). Nosso objetivo foi estudar o envolvimento das PDCs e células NK ativadas na imunopatologia da FD. Analisando as células de pacientes *ex vivo*, observamos maior frequência de IKPDCs nos casos brandos de FD, assim como de células NK TRAIL<sup>+</sup>. Outros marcadores de ativação como o marcador de degranulação CD107a e o receptor de reconhecimento padrão TLR3 foram expressos em maiores níveis nos pacientes comparando aos controles saudáveis. As citocinas relacionadas a ativação celular - IFN $\alpha$ , TRAIL solúvel e IL12 - foram correlacionadas com os quadros brandos. Em modelos *in vitro*, o DENV induziu a transformação das PDCs em IKPDCs, em via dependente dos endossomos e da dose viral. Além disso, as IKPDCs reduziram a detecção de antígenos virais em modelos de cocultura com monócitos humanos infectados, em mecanismo dependente da via dos interferons do tipo I e independente de TRAIL. As células NK foram capazes de expressar TRAIL durante estimulação *in vitro* tanto estimuladas pelo DENV2 quanto pelo IFN $\alpha$ , sugerindo mecanismos de ativação indireta da população. Assim, observamos que o DENV pode ativar ambas as populações. A relação entre a maior ativação das PDCs e células NK promoveria maior limitação da dispersão viral, contribuindo para diminuir a intensidade da resposta inflamatória. Sugerimos então que a ativação do eixo antiviral PDCs-Células NK contribuiria para proteção dos quadros graves durante a dengue.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### DENGUE AND INNATE IMMUNOLOGY: STUDY OF ANTIVIRAL AND CYTOTOXIC FACTORS IN PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS AND NK CELLS DURING DENGUE VIRUS INFECTION

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Mariana Gandini

Dengue virus is a flavivirus that can cause a hemorrhagic febrile syndrome, in which some severe cases are characterized by plasma accumulation in cavities. It is suggested that a high viral burden in the acute phase would lead to an enhanced production of inflammatory mediators, leading to plasma leakage. Innate immunity is an important barrier limiting viral spread. Plasmacytoid dendritic cells (PDCs) and NK cells are main actors in the beginning of infection because of their antiviral and cytotoxic features against infected cells. PDC killer phenotype (IKPDCs) is induced by viral activation and main profile is membrane expression of TNF-related apoptosis-inducer ligand (TRAIL) and type I interferon production. NK cells can be activated directly, by target recognition, or indirectly, by cytokines (like interferons) and become cytotoxic, expressing membrane TRAIL. Despite its antiviral role, the function of those cell populations during dengue fever (DF) is not largely known. Our aim was to study activated PDCs and NK cells involvement in DF immunopathology. DF patients' cells analysis *ex vivo* presented higher frequency of IKPDCs and also higher frequency of TRAIL<sup>+</sup>NK cells in mild DF cases. NK activation markers such as CD107a degranulation marker and pattern recognition receptor TLR3 were upregulated in patients' cells compared to healthy donors. Cytokines – IFN $\alpha$ , soluble TRAIL, IL12 – related to cell activation were upregulated in mild DF cases. *In vitro* models show DENV induced transformation of PDCs into IKPDCs, in endosome and viral-dependent pathways. Besides, IKPDCs could reduce viral antigen detection on co-culture models with human infected monocytes, in a type I interferon-dependent, TRAIL-independent mechanism. DENV-stimulated and IFN $\alpha$ -stimulated NK cells were able to express TRAIL *in vitro*, suggesting an indirect activation of cells. Therefore, we observed DENV-induced activation of both populations studied. A higher activation of PDCs and NK cells would promote limited viral spread, resulting in diminished inflammatory response. Then, we suggest that activation of antiviral axis PDCs-NK cells would promote protection against severity during dengue.

# SUMÁRIO

---

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Introdução .....   | 1  |
| 1.1   | A dengue.....  | 1  |
|       | Manifestações clínicas.....  | 1  |
|       | Epidemiologia e ciclo de transmissão .....                         | 4  |
|       | O vírus dengue .....   | 5  |
|       | Características estruturais .....                                  | 5  |
|       | Replicação viral .....   | 5  |
|       | Células alvo da replicação viral .....                             | 6  |
|       | Imunopatogenia da dengue.....                                      | 7  |
|       | Facilitação por anticorpos.....                                    | 8  |
|       | Virulência viral .....   | 8  |
|       | O polimorfismo genético.....                                       | 8  |
|       | O pecado original .....  | 9  |
|       | A resposta imunológica inata durante a dengue .....                | 9  |
|       | Papel dos interferons do tipo I, das células NK e PDCs .....       | 13 |
| 1.2   | As células da resposta imunológica inata.....                      | 15 |
| 1.2.1 | As células dendríticas plasmacitoides .....                        | 16 |
|       | Populações e distribuição das PDCs .....                           | 16 |
|       | Reconhecimento de antígenos pelas PDCs.....                        | 17 |
|       | Receptores TLR intracelulares das PDCs .....                       | 18 |
|       | Ativação das PDCs.....   | 21 |
|       | IKPDCs: as PDCs “killer” produtoras de IFN do tipo I.....          | 24 |
|       | As PDCs na imunidade antiviral .....                               | 27 |
|       | As PDCs durante a imunopatologia da dengue .....                   | 29 |
| 1.2.2 | As células Natural Killer .....                                    | 30 |
|       | Populações e distribuição de células NK .....                      | 30 |
|       | Reconhecimento das células alvo pelas células NK.....              | 31 |
|       | Receptores ativadores e inibitórios da resposta de células NK..... | 33 |
|       | Função efetora das células NK .....                                | 35 |
|       | As células NK na imunidade antiviral .....                         | 39 |
|       | As células NK durante a imunopatologia da dengue .....             | 43 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2     | Objetivos .....  | 44 |
| 2.1   | Objetivos específicos .....  | 44 |
| 3     | Metodologia .....  | 45 |
| 3.1   | Considerações éticas de amostras humanas.....                          | 45 |
| 3.2   | Amostras de pacientes e de doadores saudáveis .....                    | 45 |
| 3.3   | Critérios para classificação de dengue e diagnóstico laboratorial..... | 45 |
| 3.4   | Material e reagentes .....   | 46 |
| 3.4.1 | Meios de cultura e suplementos .....                                   | 46 |
| 3.4.2 | Reagentes.....   | 46 |
| 3.4.3 | Anticorpos .....   | 47 |
| 3.4.4 | Soluções .....   | 48 |
| 3.5   | Cepa e massa viral .....   | 49 |
| 3.5.1 | Manutenção da Linhagem celular.....                                    | 49 |
| 3.5.2 | Cepa viral.....  | 49 |
| 3.5.3 | Crescimento da massa viral .....                                       | 49 |
| 3.5.4 | Ultracentrifugação da massa viral .....                                | 49 |
| 3.5.5 | Titulação viral.....   | 50 |
| 3.6   | Isolamento de células humanas .....                                    | 51 |
| 3.6.1 | Isolamento de leucócitos humanos do sangue periférico.....             | 51 |
| 3.6.2 | Isolamento de monócitos de PBMCs.....                                  | 52 |
| 3.6.3 | Isolamento de PDCs de PBMCs.....                                       | 53 |
| 3.7   | Modelos de cultura <i>in vitro</i> .....                               | 53 |
| 3.7.1 | Estimulação de PBMCs .....   | 53 |
| 3.7.2 | Infecção e tratamento de monócitos.....                                | 54 |
| 3.7.3 | Estimulação das PDCs .....   | 54 |
| 3.7.4 | Modelos de coculturas autólogas .....                                  | 54 |
| 3.8   | Citometria de Fluxo .....  | 56 |
| 3.8.1 | Imunofenotipagem de células de pacientes .....                         | 56 |
| 3.8.2 | Marcação de antígenos de superfície das células em cultura.....        | 56 |
| 3.8.3 | Marcação para apoptose das células em culturas .....                   | 56 |
| 3.8.4 | Marcação de antígenos intracelulares das células em cultura.....       | 57 |
| 3.8.5 | Equipamentos e programas de análises .....                             | 57 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.9   | Imunofluorescência e microscopia tridimensional .....                                   | 58  |
| 3.10  | Detecção de citocinas.....  | 59  |
| 3.11  | Análises estatísticas .....   | 59  |
| 4     | Resultados .....  | 60  |
| 4.1   | Ativação de PDCs circulantes e produção de fatores solúveis durante a febre da dengue . | 60  |
| 4.2   | As PDCs durante a estimulação <i>in vitro</i> com DENV-2 .....                          | 64  |
| 4.2.1 | Ativação de PDCs pelo DENV-2.....   | 64  |
| 4.2.2 | Localização de TRAIL e DENV-2 nas PDCs .....  | 70  |
| 4.2.3 | Associação de antígenos virais com TRAILm em PDCs.....                                  | 75  |
| 4.3   | Coculturas de PDCs com monócitos autólogos infectados .....                             | 78  |
| 4.3.1 | PDCs ativadas e influência na carga viral .....   | 78  |
| 4.3.2 | Efeito do TRAIL membranar das PDCs na detecção de antígenos virais nos monócitos        | 81  |
| 4.3.3 | Efeito do IFN $\alpha$ na detecção dos antígenos virais intracelulares .....            | 84  |
| 4.3.4 | Associação entre IFN $\alpha$ e TRAIL e a detecção do antígeno viral intracelular ..... | 87  |
| 4.4   | Células NK durante a infecção natural pelo DENV .....                                   | 91  |
| 4.5   | Células NK durante estimulação <i>in vitro</i> com DENV .....                           | 96  |
| 4.5.1 | Efeito da estimulação viral na alteração de frequência das células NK.....              | 96  |
| 4.5.2 | Expressão de marcadores de ativação nas células NK <i>in vitro</i> .....                | 97  |
| 4.5.3 | Influência dos fatores solúveis nas células NK durante a estimulação viral de PBMCs     | 101 |
| 5     | Discussão.....  | 107 |
| 5.1   | As PDCs durante a infecção pelo vírus Dengue .....                                      | 107 |
| 5.2   | As Células NK durante a infecção pelo vírus dengue .....                                | 122 |
| 6     | Conclusões.....   | 136 |
| 7     | Referências Bibliográficas.....   | 140 |
| 8     | Anexos 166  |     |
| 8.1   | Anexo 1: Artigo científico com resultados incluídos na tese .....                       | 166 |
| 8.2   | Anexo 2: Artigos científicos publicados no período .....                                | 181 |
| 8.3   | Anexo 3: Cópia do termo de consentimento assinado pelos participantes do estudo .....   | 204 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.1: Classificação dos casos de dengue de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2009).  | 2  |
| Figura 1.2: Reconhecimento de antígenos pelas PDCs.   | 21 |
| Figura 1.3: Teorias do reconhecimento de células alvo pelas células NK.   | 32 |
| Figura 3.1: Imunofluorescência da titulação viral.  | 51 |
| Figura 3.2: Modelo de cocultura autóloga de IKPDCs e monócitos infectados.  | 55 |
| Figura 4.1: Perfil de ativação de células dendríticas plasmacitoides (PDCs) e fatores solúveis IFN $\alpha$ e TRAIL em pacientes com Febre do Dengue. | 63 |
| Figura 4.2: Células dendríticas plasmacitoides TRAIL positivas durante estimulação pelo DENV-2 (sobrenadante de cultura).                             | 65 |
| Figura 4.3: Massa viral ultracentrifugada: preparação e infectividade.  | 67 |
| Figura 4.4: Células dendríticas plasmacitoides TRAIL positivas e produção de IFN $\alpha$ durante estimulação pelo DENV-2 (ultracentrifugado).        | 69 |
| Figura 4.5: Localização do TRAIL em PDCs estimuladas por DENV-2 por análise microscopia 3D.   | 72 |
| Figura 4.6: Microscopia 3D das partículas de DENV-2 em PDCs.  | 74 |
| Figura 4.7: Testes de infecção e neutralização em PDCs e monócitos infectados com DENV-2.   | 77 |
| Figura 4.8: Coculturas de PDCs e monócitos autólogos: estratégia de análise e detecção do antígeno viral.   | 80 |
| Figura 4.9: Co-culturas de PDCs e monócitos autólogos: análise da função do TRAIL membranar em PDCs.  | 83 |
| Figura 4.10: Coculturas PDCs e monócitos autólogos: análise do IFN- $\alpha$ solúvel e do número de PDCs cultivadas.                                  | 86 |
| Figura 4.11: Coculturas PDCs e monócitos autólogos: relação IFN $\alpha$ e TRAIL na superfície dos monócitos.   | 89 |
| Figura 4.12: Frequência de células Natural Killer durante a fase aguda da dengue.   | 91 |
| Figura 4.13: Perfil de ativação de células <i>Natural Killer</i> e detecção de IL12 em pacientes com febre do dengue.                                 | 95 |
| Figura 4.14: Frequência de células NK em PBMCs estimuladas com DENV-2 <i>in vitro</i>   | 97 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 4.15: Ativação das células NK em culturas de PBMC pelo DENV-2:<br>expressão de TRAIL, CD107a e TLR3   | 100 |
| Figura 4.16: Produção de IFN $\alpha$ e IL12 durante a estimulação de PBMCs com<br>DENV-2                    | 102 |
| Figura 4.17: Relação entre a Indução de TRAIL membranar em células NK pelo<br>DENV-2 e os interferons tipo I | 105 |
| Figura 5.1: Interação entre PDCs e células NK durante a infecção pelo DENV.                                  | 134 |

## ***LISTA DE TABELAS***

---

|  |    |
|--|----|
| Tabela 4.1: Informações demográficas, clínicas e laboratoriais sobre o estudo de PDCs em pacientes com dengue..... | 61 |
| Tabela 4.2: Informações demográficas sobre o estudo de células NK em pacientes infectados com dengue .....         | 92 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

|                  |   |
|------------------|---|
| AP-1             | Proteína ativadora-1 (do inglês Activator Protein-1)  |
| APCs             | Células apresentadoras de antígenos (do inglês Antigen Presenting Cells)                              |
| BDCA-2           | Antígeno de célula dendrítica do sangue-2 (do inglês blood dendritic cell antigen-2)                  |
| BDCA-4           | Antígeno de célula dendrítica do sangue-4 (do inglês blood dendritic cell antigen-4)                  |
| CCL3             | Quimiocina de motivo C-C ligante 3 (do inglês chemokine C-C motif ligand 3)                           |
| CCL4             | Quimiocina de motivo C-C ligante 4 (do inglês chemokine C-C motif ligand 4)                           |
| CCL5             | Quimiocina de motivo C-C ligante 5 (do inglês chemokine C-C motif ligand 5)                           |
| CCR7             | Receptor de quimiocina de motivo C-C 7 (do inglês chemokine receptor C-C motif 7)                     |
| CD               | Cluster de diferenciação (do inglês cluster of differentiation)                                       |
| CMKRL1           | Receptor de similar a quimiocina-1 (do inglês chemokine-like receptor-1)                              |
| CpG              | Oligonucleotídeo rico em repetições citosina-guanina  |
| CXCL             | Quimiocina de motivo C-X-C ligante (do inglês chemokine C-X-C motif ligand)                           |
| CXCR             | Receptor de quimiocina de motivo C-X-C (do inglês chemokine receptor C-C motif)                       |
| DCIR             | Imunoreceptor de células dendríticas (do inglês dendritic cell immunoreceptor)                        |
| DCs              | Células Dendríticas (do inglês Dendritic cells)   |
| DENV             | Vírus dengue  |
| dsRNA            | ácido ribonucleico de dupla fita (do inglês double stranded ribonucleic acid)                         |
| eIF3             | fator de iniciação eucariótico 3 (do inglês eucariotic initiation factor 3)                           |
| eIF $\alpha$     | fator de iniciação eucariótico alfa (do inglês eucariotic initiation factor alpha)                    |
| Fc               | Fragmento cristalizado (do inglês crystallizable fragment)  |
| FcyR             | Receptor do fragmento Fc da imunoglobulina gama (do inglês Fc gamma receptor)                         |
| Fc $\alpha$ R    | Receptor do fragmento Fc da imunoglobulina alfa (do inglês Fc alpha receptor)                         |
| Fc $\epsilon$ RI | Receptor do fragmento Fc da imunoglobulina epsilon (do inglês Fc epsilon receptor)                    |
| Flt3-L           | Ligante do receptor classe III tirosina quinase (do inglês class-III receptor tyrosine kinase ligand) |
| GTPase           | Trifosfatase guanossina (do inglês guanosine triphosphatase)  |
| HEV              | Veia do endotélio alto (do inglês high endothelial vein)  |

|        |  |
|--------|--|
| HLA    | Antígeno de leucócito humano (do inglês human leukocyte antigen)   |
| HSV    | Vírus Herpes Simplex (do inglês Herpes Simplex Virus)  |
| ICOSLG | Ligante do estimulador de célula T induzido (do inglês inducible T-cell co-stimulator ligand)                                  |
| IFIT   | Proteínas induzidas por IFN com repetições tetratricopeptídicas (do inglês IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats) |
| IFITM  | Proteínas transmembranas induzidas por IFN (do inglês IFN-induced transmembrane protein)                                       |
| IFN    | Interferon   |
| IFNAR  | Receptor de IFN alfa/beta (do inglês interferon alpha/beta receptor)   |
| IL     | Interleucina   |
| IPCs   | Células produtoras de IFN (do inglês IFN producing cells)  |
| IRAK1  | Quinase associada ao receptor da interleucina 1 (do inglês interleukin-1 receptor (IL1R)-associated kinase)                    |
| IRF    | Fatores reguladores de interferon (do inglês Interferon regulatory factors)  |
| ISGs   | Genes estimulados por interferon (do inglês interferon stimulated genes)   |
| JAK    | Quinase de Janus (do inglês Janus Kinase)  |
| LAMP   | (do inglês lysosomal-associated membrane protein)  |
| MDCs   | Células dendríticas mieloides (do inglês myeloid dendritic cells)  |
| MHC    | Complexo de histocompatibilidade maior (do inglês major histocompatibility complex)  |
| NFκB   | Fator nuclear kappa beta (do inglês nuclear factor kappa beta)   |
| NK     | Matora natural (do inglês Natural Killer)  |
| NKp44  | Proteína 44 das células NK (do inglês NK cell protein 44)  |
| NLR    | Receptores similares ao NOD (do inglês NOD-like receptores)  |
| NOD    | Receptores com domínio de oligomerização de nucleotídeos (do inglês nucleotide oligomerization domain receptors)               |
| OAS    | Sintetase de oligoadenilato (do inglês oligoadenylate synthetase)  |
| PAMPs  | Padrão molecular associado a patógenos (do inglês PAMPs pathogen-associated molecular pattern)                                 |
| PDCs   | Células dendríticas plasmacitoides (do inglês plasmacytoid dendritic cells)  |
| PD-L1  | Ligante 1 da morte programada (do inglês programmed death ligand 1)  |
| PKR    | Proteína quinase R (do inglês protein kinase R)  |
| PRRs   | Receptores de reconhecimento padrão (do inglês Pattern Recognition Receptor)   |
| RAG    | Proteína ativadora da recombinação (do inglês Recombination Activating Protein)  |
| RE     | Retículo endoplasmático  |

|              |   |
|--------------|---|
| RIG          | Gene do ácido retinoico induzido (do inglês retinoic acid-inducible gene)   |
| RNaseL       | Ribonuclease L  |
| RSV          | Vírus respiratório sincicial (do inglês Respiratory syncytial virus)  |
| ssRNA        | ácido ribonucleico de fita simples (do inglês single stranded ribonucleic acid)   |
| TAP          | Proteína transportadora associada ao processamento de antígenos (do inglês Transporter associated with antigen processing)          |
| TCR          | Receptor de célula T (do inglês T-cell receptor)  |
| TIR          | Receptor Toll-interleucina (do inglês Toll-interleukin receptor)  |
| TLR          | Receptor do tipo Toll (do inglês Toll-like receptor)  |
| TNF $\alpha$ | Fator de necrose tumoral alfa (do inglês tumoral necrosis factor)   |
| TRAF6        | Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (do inglês tumor necrosis factor receptor-associated factor)                |
| TRAIL        | Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (Tumor Necrosis Factor-Alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand) |
| TRIF         | Adaptador de indução do IFNbeta contendo domínios TIR (do inglês TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta)            |
| WNV          | Vírus do Oeste do Nilo (do inglês West Nile Virus)  |

# 1 Introdução

---

## 1.1 A dengue

A dengue é uma infecção viral que pode apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas, e é caracterizada por alta morbidade e baixa letalidade, na sua forma conhecida como Dengue Grave (DG). Essa patologia é causada pelo vírus Dengue, pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. Existem quatro sorotipos do vírus: Dengue-1 (DENV-1), Dengue-2 (DENV-2), Dengue-3 (DENV-3) e Dengue-4 (DENV-4), que são classificados de acordo com critérios imunológicos e biológicos e todos os sorotipos são capazes de causar o amplo espectro de quadros patológicos da dengue. (1)

A dengue se tornou a arbovirose (doença transmitida por artrópodes) mais difundida no mundo e está presente em todos os continentes, atingindo mais de 100 países. As áreas tropicais são as mais atingidas pelo fato de estarem densamente povoadas pelo mosquito transmissor *Aedes aegypti*, que é responsável pela manutenção do ciclo de transmissão do vírus (2). Não existem vacinas licenciadas e nem medicamentos específicos contra a doença. Atualmente, três e meio bilhões de pessoas estão em áreas de risco para a doença. As estimativas indicam que anualmente devam ocorrer cerca de cem milhões de casos da Febre da Dengue (FD) e quinhentos mil casos de casos graves (3).

### Manifestações clínicas

Um amplo espectro de quadros clínicos pode ser causado pelo DENV. Na maioria dos casos ocorrem manifestações assintomáticas. Os sintomáticos apresentam inicialmente sintomas brandos como uma febre indiferenciada que pode ser caracterizada como febre da dengue (FD); ou ainda, evoluir para quadros clínicos mais graves como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a Síndrome do Choque da Dengue (SCD), de acordo com a classificação clássica da Organização

Mundial da Saúde (OMS) (1997), ou Dengue Grave (DG) como a classificação da OMS de 2009 (4).

Os problemas encontrados em seguir os parâmetros clássicos da OMS na triagem de casos graves da dengue evidenciaram a necessidade de um estudo amplo para estabelecer um esquema de classificações que possa ser utilizado por todas as regiões endêmicas (5). Uma iniciativa apoiada pela OMS intitulada *Dengue Control* (DENCO) realizou um estudo de avaliação dos sinais e sintomas associados com a gravidade, apresentando nova classificação clínica em uso pela OMS desde 2009 (Figura 1.1), que leva em conta os níveis de gravidade para o atendimento clínico (6).



**Figura 1.1: Classificação dos casos de dengue de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2009).**

A nova classificação divide os casos de dengue em Dengue sem sinais de alerta, Dengue com sinais de alerta e Dengue Grave. Os critérios para cada classificação estão expostos na figura.

Em linhas gerais, a dengue é uma doença de baixa mortalidade, em que podem ocorrer infecções sequenciais por diferentes sorotipos, e acometer crianças e adultos. Caracterizam a doença: o aparecimento súbito de febre alta, dor de cabeça,

dor retro-orbital, artralgia, mialgia, anorexia e desconforto abdominal. Eritemas máculo-papular podem ser detectados em alguns casos. A febre pode ser bifásica, podendo durar de 2 a 7 dias. As manifestações hemorrágicas podem ocorrer em alguns indivíduos com FD. Em geral, os dados laboratoriais associados à FD incluem neutropenia com linfocitose subsequente, marcada pela presença de linfócitos atípicos. A trombocitopenia é também comum, 34% de pacientes com FD possuem contagem de plaquetas menor do que 100.000/mm<sup>3</sup> (6).

De acordo com a nova classificação da OMS (Figura 1.1), adotada no Brasil, dentro do grupo dos pacientes mais brandos, os quadros clínicos são subdivididos em dengue com sinais de alerta (DCSA) e dengue sem sinais de alerta (DSSA). Essa divisão não exclui a evolução de pacientes DSSA à gravidade, mas torna o atendimento clínico mais eficiente. Os sinais de alerta são: dor abdominal ou enrijecimento do abdome, vômito persistente, acumulação clínica de fluidos, sangramento de mucosas, letargia, inquietude, aumento em mais de 2cm do fígado, e aumento do hematócrito concomitante à queda brusca do número de plaquetas. Nos casos de Dengue Grave (DG), os pacientes devem apresentar um extravasamento grave de plasma, que levará ao choque hipovolêmico, ou ao estresse respiratório, devido ao acúmulo de fluidos; sangramento grave; ou acometimento grave de órgãos como fígado (enzimas hepáticas maior que 1000), sistema nervoso central (perda de consciência) e coração (6). Os pacientes que se recuperam logo após a defervescência e com confirmação de dengue laboratorial são considerados DSSA. Os pacientes que após a defervescência sofrem um agravamento no quadro clínico, geralmente apresentam os sinais de alerta (DCSA) e a contínua evolução da gravidade caracteriza a Dengue Grave. É consenso que a classificação de 2009 é mais sensível em diagnosticar os quadros mais graves em comparação à classificação antiga de 1997(7).

## Epidemiologia e ciclo de transmissão

A urbanização e a facilitação das viagens internacionais facilitou o espalhamento do DENV no mundo, principalmente nas faixas tropicais. No Brasil, o surgimento da FD diagnosticada laboratorialmente ocorreu na década de 80 com a entrada do DENV-1 pelo estado de Roraima, região Norte do país (8). Em seguida, o DENV-1 também foi responsável pelas epidemias de 1986 em Alagoas, Ceará e Rio de Janeiro (9); e de 1987 em Mato Grosso do Sul, Bahia e Pernambuco (10). Em 1990, foi detectado o sorotipo DENV-2 pela primeira vez no Brasil, no estado do Rio de Janeiro, e a circulação simultânea do DENV-1 e DENV-2 foi correlacionada com o aparecimento dos primeiros casos hemorrágicos no estado (11). Em 2001, foram detectados casos autóctones de DENV-3 no Rio de Janeiro (12). Este sorotipo causou uma das maiores epidemias relatadas no país de FD/FHD no Rio de Janeiro (13). A entrada do DENV-4 ocorreu inicialmente em 1981 (8), porém epidemias foram registradas apenas a partir de 2010 no estado de Rondônia (14). Atualmente, o panorama epidemiológico da FD no Brasil apresenta um quadro de endemia com subseqüentes epidemias periódicas (15), ocorrendo a circulação autóctone dos 4 sorotipos. Desde 2008, a doença vem apresentando uma maior incidência de hospitalização de crianças. No ano de 2010, foram registrados mais de 1,2 milhões casos de dengue no Brasil situando a dengue como importante problema de saúde pública (16). Em 2013, a região Sudeste, responsável por 63,4% dos casos com 936.500 registros (17).

Os mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (*A. aegypti*; *A. albopictus*; *A. polynesiensis*) são os principais transmissores do DENV. Dependendo da região geográfica, podemos encontrar diferentes densidades das espécies, porém o principal vetor transmissor é o *Aedes aegypti*. Ciclos silvestres e peridomésticos são mantidos na natureza, tendo como hospedeiros mosquitos e macacos. Entretanto, o principal ciclo de transmissão envolvido em epidemias é o urbano. Após o mosquito picar o ser humano, o DENV penetra na fêmea adulta. A primeira replicação ocorre no intestino delgado, atinge a hemocele e a hemolinfa, ganhando acesso aos tecidos do inseto. Ocorre uma segunda replicação nas glândulas salivares, permitindo a transmissão do vírus aos seres humanos numa próxima alimentação do mosquito. Os vírus também podem infectar o aparelho genital dos vetores, possibilitando a transmissão trans-ovariana do patógeno. Esse tipo de infecção, sem participação de

seres humanos ou outros vertebrados, possivelmente é responsável pela manutenção do vírus em uma determinada região nos períodos inter-epidêmicos, porém a transmissão assintomática em humanos não pode ser descartada (3, 18).

## O vírus dengue

### *Características estruturais*

Os vírions dos membros do gênero *Flavivirus* têm diâmetro aproximado de 500Å e o seu genoma é composto de uma fita de RNA simples com senso positivo. O material genético é envolvido pela proteína do capsídeo e externamente pela membrana bilipídica da célula hospedeira com a inclusão de várias cópias de duas glicoproteínas virais (19). O genoma dos flavivírus possui uma ORF (fase aberta de leitura) de 11 Kb, codificando um único polipeptídeo. A porção amino terminal do genoma codifica as três proteínas que formam a estrutura viral – a proteína do capsídeo (C), a proteína de membrana (M, transcrita como o precursor prM) e a proteína do envelope (E). O restante do genoma codifica sete proteínas não estruturais – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. O processo pós-tradução envolve a atuação de enzimas da célula hospedeira e de enzimas virais, resultando na clivagem do polipeptídeo em dez proteínas virais (20).

A estrutura externa do vírion varia com o estado de maturação das proteínas do envelope, que é formado pelo dímero prM-E. Os vírions possuem 180 cópias do dímero na camada mais externa do envelope viral, enquanto a camada mais interna é derivada da membrana celular da célula hospedeira. As partículas imaturas possuem 90 dímeros de prM-E e nas 60 junções triméricas observamos espículas projetadas para a superfície do vírus. Já as partículas maduras apresentam 90 dímeros de M-E formando uma superfície mais lisa (21). Internamente, o nucleocapsídeo é constituído pelas proteínas C que envolvem o RNA viral (22).

### *Replicação viral*

As proteínas não-estruturais do vírus exercem funções na replicação viral que estão relacionadas com a sua localização no compartimento celular. A proteína NS1 é detectada no lúmen do retículo endoplasmático, colocalizada próximo a RNA de dupla fita (23), onde ancoraria o complexo proteico replicativo na membrana do retículo endoplasmático (22). A NS3 é encontrada no citoplasma, atuando como helicase de RNA, e como protease, junto com NS2B, para algumas proteínas virais.

A NS5 é a polimerase de RNA dependente de RNA e também acumula a função metiltransferase (22). A proteína NS4 possui duas subunidades envolvidas na alteração de membranas intracelulares cruciais para replicação (24) e a subunidade NS4B auxilia a NS3 durante a replicação do RNA viral (25).

O ciclo replicativo dos flavivírus se inicia com a adsorção ou ligação dos vírions na superfície celular via receptores de adesão e auxiliares, seguindo de internalização por endocitose mediada por clatrina (26). O ambiente ácido do endossomo secundário catalisa as mudanças conformacionais da proteína E, ou seja, a exposição de seu domínio hidrofóbico. Essa mudança possibilita a ligação e fusão da membrana viral com a membrana endossomal. O genoma viral é liberado no citoplasma e é imediatamente traduzido em uma única poliproteína, que é processada por proteases virais e celulares, originando o complexo replicativo (CR). Esse complexo é composto de todas as proteínas NS e um fator do hospedeiro desconhecido, e apresenta-se como uma invaginação na membrana do retículo endoplasmático. No CR ocorre a amplificação do RNA viral e inicia-se a montagem do vírion. As proteínas do capsídeo envolvem o RNA viral, que em sequência são recobertos pela membrana do RE contendo as glicoproteínas prM e E. Esses vírions imaturos são transportados para o complexo de Golgi, onde sofrem glicosilação das proteínas do envelope. Na rede trans-Golgi, as furinas, através da clivagem de prM, promovem a maturação do envelope viral. Os vírus maduros são liberados no citoplasma por exocitose (19, 27, 28).

### *Células alvo da replicação viral*

As células-alvo para o DENV são principalmente as células do sistema fagocítico mononuclear: células dendríticas, monócitos e macrófagos residentes. A investigação de tecidos de pacientes infectados com DENV localizou antígenos virais em células fagocíticas em linfonodo, baço e pulmão (29, 30); em células perivasculares do cérebro e também em hepatócitos e células de Kupfer (31-35). Em modelo murino, observou-se a importância de células mieloides para replicação e disseminação viral (36). Modelos *in vitro* confirmam a permissibilidade de monócitos humanos à replicação pelo DENV (34, 37). Várias linhagens epiteliais, endoteliais e fibroblásticas suportam a replicação viral (38). Wu e colaboradores (2000) demonstraram que células dendríticas (DCs) intersticiais e células de Langerhans são mais permissivas ao vírus que monócitos e macrófagos, fazendo das DCs mieloides os principais alvos de replicação do DENV (39).

Desse modo, sugere-se que, nas infecções naturais, o DENV é inoculado pelo vetor no espaço subcutâneo ou no espaço intradérmico. A replicação viral ocorreria nas populações celulares do local - nas células retículo-endoteliais, nas células de Langerhans ou nos fibroblastos. A capacidade migratória das DCs infectadas poderia favorecer a disseminação viral para outras populações celulares, preferencialmente nos monócitos circulantes e propiciar o estabelecimento da infecção ativa (40).

A penetração do DENV nos fagócitos humanos é mediada por moléculas de superfície, relacionadas à adesão intracelular ou à endocitose (41). Apesar das células alvo em questão apresentarem diversos receptores em comum, o DENV não parece ser internalizado por um receptor exclusivo. A penetração viral parece depender do tipo celular. Por exemplo, a replicação do DENV em células dendríticas diferenciadas de monócitos é auxiliada pela lectina tipo C DC-SIGN (do inglês *dendritic cell ICAM-3 grabbing nonintegrin*) que reconhece oligossacarídeos com alta frequência de manose e glicanas fucosiladas (42, 43). Já em macrófagos, foi observado o envolvimento do receptor de manose (MR) (44) como mediador da penetração viral. Ao contrário do DC-SIGN residente nas membranas celulares, o MR é internalizado constitutivamente na via endocítica, ligando-se a manose, fucose e N-acetil glicosaminas presentes nas glicoproteínas virais. No caso dos monócitos humanos, a penetração da partícula viral foi dependente de CD14 (45) e também de heparan sulfato (46).

## **Imunopatogenia da dengue**

Acredita-se que o ponto crítico da patologia que levaria a gravidade é o extravasamento plasmático de curta duração mediado pela desregulação da reposta imunológica do hospedeiro. Entretanto, uma via bioquímica ou imunológica precisa ainda não foi responsabilizada. A alta variabilidade de manifestações clínicas sugere a existência de vários fatores que atuam sinergicamente na gravidade da doença. Os fatores genéticos do hospedeiro, os genótipos e sorotipos virais, as infecções sequenciais, e as diferenças qualitativas e quantitativas dos anticorpos e das respostas celulares cruzadas durante as infecções podem ser correlacionadas com a imunopatogenia (47).

### *Facilitação por anticorpos*

Acredita-se que a resposta imunológica contra o sorotipo infectante do DENV promove imunidade duradoura a este sorotipo, e também, por até seis meses, aos outros sorotipos. Apesar de protetora, a resposta humoral também poderia impactar na gravidade da doença. Dados epidemiológicos apontam como fatores de risco a infecção sequencial por dengue ou a infecção primária em crianças nascidas de mães flavivírus-ímmunes (48, 49). Segundo a teoria da facilitação dependente de anticorpos (ADE), os anticorpos heterólogos não seriam eficientes em neutralizar as partículas virais de outros sorotipos e a fagocitose desses imunocomplexos resultaria no aumento da infecção de células da linhagem monocítica (50, 51).

### *Virulência viral*

Sugere-se também que a virulência da cepa viral infectante seja responsável pela gravidade da doença, visto que as formas graves podem ocorrer também em infecções primárias (52) e que altas cargas virais são correlacionadas com a gravidade (53). O sequenciamento genético de cepas circulantes revelou que o genótipo americano raramente está associado à FHD/SCD (54), enquanto o oposto ocorreria com as cepas asiáticas (55). Entretanto, o aumento do número de casos graves nas Américas, pode ser explicado pela introdução de cepas com genótipo asiático no continente que teriam maior vantagem seletiva sobre as cepas americanas (56, 57). Além do genótipo, o envolvimento de certos sorotipos com a gravidade também foi relatado: DENV-2 e DENV-3 estariam ligados a um maior número de casos graves, enquanto DENV-1 e DENV-4 promoveriam mais casos brandos (58).

### *O polimorfismo genético*

Alelos nos genes da resposta imunológica foram correlacionados com gravidade ou proteção, indicando a contribuição dos fatores genéticos do hospedeiro na imunopatologia. A suscetibilidade da doença foi correlacionada com polimorfismos em moléculas de HLA, receptores celulares, incluindo os receptores de interferons do tipo I (IFNARs), receptor de vitamina D, receptores de lectina (DC-SIGN e CLEC5A e genes de citocinas (59, 60). Ainda com relação ao fator hospedeiro, um estudo clássico no Haiti apontou que diferentes suscetibilidades aos quadros mais graves existiriam entre etnias (61).

### ***O pecado original***

Investigações mostram que durante as infecções secundárias por dengue, ocorre maior expansão de células T com baixa avidéz para o sorotipo infectante e alta avidéz para o sorotipo de uma infecção anterior. Esses dados sugerem que existiria uma intensa resposta celular cruzada não protetora, ou teoria do pecado original, que envolve as células T heterólogas (62, 63). Ainda, foi observado que essas células seriam específicas para antígenos da proteína NS3, e com perfil de intensa produção de citocinas e baixa citotoxicidade (CD107a reduzido) (64). Essa população, então, seria ineficiente em controlar a carga viral precocemente através citotoxicidade a células infectadas e contribuiria para o quadro de “cytokine storm” (intensa produção de citocinas) observado durante os quadros de dengue.

### **A resposta imunológica inata durante a dengue**

Durante o estabelecimento das infecções, a resposta imunológica inata é uma das primeiras a ser ativada pelo comportamento patogênico, principalmente através da detecção do aumento de partículas virais através dos receptores de padrões moleculares do patógeno (PRRs) (65). As fases iniciais da replicação viral podem levar a ativação de populações celulares da resposta inata, como monócitos, macrófagos, células dendríticas e células NK. A ação efetora dessas populações celulares resulta na rápida resposta antiviral que pode ser exemplificada pela ação dos interferons do tipo I, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a citotoxicidade à células infectadas. (66) A resposta efetora de células da imunidade inata representa um vasto campo de estudo na imunopatologia da dengue e vem sendo pouco explorada até o momento. Apesar disso, várias investigações detalham a interação entre as células alvo e as proteínas virais. Nessas células, a interferência de proteínas do DENV em vias da resposta inata é descrita - tanto no reconhecimento das partículas virais, quanto na ação efetora (67).

Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) codificados pelo hospedeiro, residentes tanto no citoplasma quanto no sistema endossomal, podem ser ativados durante a replicação do DENV. Esse fato é explicado pela detecção de proteínas virais nos dois compartimentos citados. A replicação viral ocorre no citoplasma e as partículas virais penetram na célula através da rede de endossomos. Assim, tanto os PRRs citoplasmáticos quanto os endossomais podem

potencialmente reconhecer as partículas virais e seus produtos replicativo, levando a ativação de vias inflamatórias e antivirais. (20)

No citoplasma, os receptores citosólicos RIG-I (gene induzido pelo ácido retinoico - I) e MDA5 (fator de diferenciação do mieloma - 5) reconhecem a fita dupla dos RNAs não próprios, através da presença de trifosfatos na extremidade 5' do RNA ou RNAs longos, respectivamente (68). O DENV é reconhecido tanto por MDA5 quanto por RIG-I (69). Investigações apontam que a interferência dessa via de reconhecimento está intrinsecamente ligada ao aumento da carga viral (69-71). Ainda, sugere-se que o formato do complexo replicativo (invaginação para o interior do ER) seja fundamental para retardar o reconhecimento dos vários tipos de RNA de flavivirus presentes nessa "bolsa" (72). O DENV escaparia da via de reconhecimento do MDA5, através da clivagem proteica do mediador STING presente na membrana do retículo endoplasmático. Essa clivagem é específica para os seres humanos, uma vez que o complexo NS2B3 foi ineficaz em clivar o mesmo fator em camundongos. Confirmando a importância do papel do reconhecimento citosólico contra a replicação viral, recentemente mostrou-se que o pré-tratamento com agonistas de RIGI é eficiente em bloquear a infecção viral. (73)

Na rede endossomal, os TLRs 3 e 7/8 podem ser ativados durante a infecção pelo DENV. As PDCs que expressam TLR7/8 são capazes de reconhecer os vírus e se tornarem funcionais (74). Além disso, o reconhecimento do genoma viral pelo TLR3 estaria envolvido na diminuição da replicação viral (69, 75). Ainda são necessários maiores esclarecimentos sobre o reconhecimento do DENV pelos TLRs, entretanto algumas investigações já relacionam a expressão diferencial de TLRs durante a infecção pelo DENV. Pacientes apresentando quadros clínicos brandos tem maior expressão dos TLRs membranares 2 e 4 (76) em monócitos e TLR3 e TLR9 em DCs mieloides (77). Experimentos em modelos de infecção em primatas não humanos apontam que a ativação dos receptores TLR3 e 7/8 resultaram na diminuição da carga viral (78). Desse modo, o reconhecimento da infecção viral pelos PRRs poderia levar a uma rápida ativação das diversas populações celulares da imunidade inata que resultaria na eliminação do vírus precocemente.

A ativação dos PRRs leva a produção de citocinas antivirais e de mediadores inflamatórios. O perfil e os níveis de citocinas produzidos nos pacientes são

considerados importantes para a patogenia da dengue, porque a presença desses mediadores foi correlacionada com a gravidade da doença.

Uma vez que as células alvo também são capazes de produzir esses mediadores solúveis quando infectadas, diversos trabalhos observaram quais seriam as principais citocinas produzidas durante a infecção. Os monócitos humanos, em investigações *in vitro*, são permissíveis a replicação pelo DENV, que induziu a produção de níveis elevados de TNF $\alpha$ , IL6, IL10, IL12 e das quimiocinas CCL8 e CXCL10; e níveis moderados de TRAIL solúvel e de IFN $\alpha$  (79) (80, 81). Ainda, quando a facilitação de anticorpos é simulada *in vitro*, observa-se além da maior replicação viral, uma maior produção de mediadores solúveis (82). Os monócitos pró-inflamatórios (CD14+ CD16+) são encontrados em maiores números em pacientes com dengue durante a fase febril da doença (76). Ainda, monócitos isolados de pacientes produziram mais mediadores solúveis (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL12, IL17, sST2, TRAIL) que pacientes de controles saudáveis (83).

As células dendríticas humanas são mais permissivas a replicação do DENV em relação aos monócitos. Na falta de um modelo murino que reproduza aspectos chaves da imunopatogenia (84), diversas investigações observaram os efeitos da infecção pelo DENV nas DCs diferenciadas de monócitos *in vitro*. A replicação viral, assim como nos monócitos, resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IL6), regulatória (IL10), antivirais (TRAIL, IFN $\alpha$ ) e de quimiocinas (CCL5, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11) (85-90). Observou-se também que a replicação viral leva a produção diferencial de citocinas pelas DCs *in vitro*, sendo que as células infectadas são produtoras de TNF $\alpha$ , enquanto as células que não apresentam antígeno viral na mesma cultura são produtoras da quimiocina CXCL10 (91). A replicação do DENV culmina na modulação da maturação das DCs, característica observada em outros flavivírus como JEV e YFV (92-95).

Durante a resposta ao estabelecimento da infecção, os mediadores inflamatórios produzidos inicialmente colaborariam para a ativação de populações celulares da resposta inata, promovendo ações antivirais e citotóxicas, por exemplo. A princípio, essa ação efetora colaboraria para resolução da viremia e reestabelecimento da homeostasia. Entretanto, a exacerbação da produção desses mediadores inflamatórios, pode ter efeito na ativação do endotélio de maneira sistêmica, culminando no extravasamento plasmático, como observado na dengue.

Patologicamente, observa-se a ausência de lesões na microvasculatura nos casos graves da dengue, sugerindo que a permeabilidade capilar seria resultado da ativação por mediadores solúveis e não da infecção viral (96). Apesar de linhagens endoteliais humanas serem infectadas pelo DENV (97), não está claro se estas células são infectadas *in vivo*. Sabe-se que monócitos infectados produzem TNF $\alpha$  e também óxido nítrico, ambos envolvidos na ativação do endotélio (98), entretanto diversos fatores solúveis podem estar envolvidos nessa ativação.

A replicação do DENV nas DCs e nos monócitos *in vitro* culmina na produção da maioria das citocinas que são encontradas em níveis elevados em pacientes e são correlacionadas aos casos mais graves. Por exemplo, o TNF $\alpha$  foi uma das primeiras citocinas correlacionadas com casos hemorrágicos da FD (99-102). Já a IL6 foi correlacionada a ativação das vias de coagulação em pacientes com choque (103, 104). A IL18 foi correlacionada com casos de Febre Hemorrágica da Dengue (105, 106), assim como a IL10 (107, 108). O papel do IFN $\gamma$  ainda é discutido, porém, investigações sugerem seu papel na gravidade, embora o IFN $\gamma$  possa induzir vias antivirais (109, 110). As DCs e monócitos também produzem citocinas que estão relacionadas a manifestações mais brandas da dengue. Maiores níveis de IL12 e a IL15 foram observadas nos casos brandos da dengue (106, 111). O IFN $\alpha$  foi detectado em quadros de febre do dengue (112), assim como o TRAIL (85). Esses dados sugerem que a replicação viral nessas populações celulares pode contribuir diretamente para a imunopatogenia, através da produção de mediadores solúveis.

Investigações relatam que, durante a replicação *in vitro* do DENV em células dendríticas, foi observada uma intensa apoptose dessas células correlacionada com a capacidade replicativa da cepa viral (113). Ainda, a replicação do DENV em monócitos humanos também resultou na apoptose dessas células (80, 83), sendo o mesmo observado para linhagens de células da microvasculatura humana (114). A apoptose pode ser considerada um dos mecanismos de interrupção da replicação viral. Entretanto, o papel da apoptose durante a infecção pelo DENV não está totalmente elucidado.

### *Papel dos interferons do tipo I, das células NK e PDCs*

Apesar da sua importância para imunidade antiviral, a resposta dos componentes celulares da imunidade inata durante a infecção pelo DENV apresenta diversas questões a serem abordadas. O papel de células dendríticas plasmacitoides e das células NK, ambas as populações com funções clássicas antivirais e/ou citotóxicas, ainda é controverso ou pouco explorado.

As PDCs são as principais produtoras dos IFNs do tipo I circulante durante as infecções virais (115). Diversos modelos *in vitro* mostram que os interferons do tipo I tem função antiviral contra o DENV e também contra outros flavivírus (116). O TRAIL, que pode ser considerado um gene de resposta aos interferons, também demonstrou função antiviral contra a replicação do DENV (117). Observa-se também que os flavivírus apresentam diversos mecanismos antagonísticos da via dos interferons, que resultariam na atenuação da produção de IFNs do tipo I, na supressão da sinalização IFNAR, no bloqueio de transcrição de diversos genes relacionados aos interferons do tipo I (118). Esses dados sugerem a importância da função efetora dessa população durante a fase inicial da dengue, principalmente no controle da carga viral. De fato, durante a dengue, observou-se que a frequência de PDCs circulantes está relacionada aos quadros clínicos (119) e também a viremia na fase aguda (120). Não há um consenso se as PDC, assim como as células dendríticas mieloides, sofreriam a replicação viral pelo DENV (70, 74, 90) e se proteínas virais poderiam interferir em alguma sinalização intracelular nessa população. Algumas investigações apontam que as partículas do DENV são capazes de ativar a resposta de interferons do tipo I em modelo *in vitro* (74, 90), sugerindo que essa população possa responder de maneira similar durante a infecção natural pelo DENV.

As células NK são células com funções citotóxicas contra células infectadas ou tumorais através do contato celular ou pela produção de IFN $\gamma$  (121). O papel dessa população durante a infecção pelo DENV ainda é controverso. Diversos trabalhos apontam que o estabelecimento da infecção pelo DENV teria um impacto positivo na frequência de células NK durante a fase aguda da doença, principalmente nas amostras de pacientes com quadros clínicos considerados mais brandos (106, 122-124). Entretanto, observa-se que o estado ativado dessas células foi correlacionado tanto com a gravidade (123, 125) quanto com a proteção (106). Sabe-se que a replicação dos flavivírus pode resultar no aumento da expressão de

MHC de classe I nas células infectadas (126), sugerindo que existam mecanismos de escape viral também da função efetora das células NK (127). Entretanto, são necessários mais estudos sobre o estado de ativação dessa população celular durante a infecção natural. As células NK também podem ser ativadas indiretamente pela presença de citocinas no microambiente. Nesse contexto, sabe-se que os interferons do tipo I e também outros mediadores podem estimular as funções citotóxicas das células NK contra células infectadas, induzindo, por exemplo, a expressão de TRAIL na superfície celular.

Uma vez que ainda existem várias questões a serem respondidas sobre o papel dessas duas populações celulares durante a infecção pelo DENV, tornou-se atraente o estudo da ativação dessas populações celulares. A descrição de mecanismos antivirais pode somar respostas às causas da imunopatologia da dengue, além de contribuir na identificação de alvos de intervenção terapêutica ou auxiliar no desenvolvimento de vacinas.

## 1.2 As células da resposta imunológica inata

O sistema imunológico é composto de um conjunto de mecanismos flexíveis com papel fundamental na manutenção da homeostase, permitindo a interação e a convivência entre as diversas populações de micro-organismos e o hospedeiro. O desequilíbrio da homeostase pode ser causado por um determinado micro-organismo em razão de seu comportamento patogênico. A proliferação desregulada de micro-organismos e/ou a destruição de células do hospedeiro durante este processo, caracteriza o estabelecimento de uma infecção ativa. Elementos da resposta imunológica inata são fundamentais para manter em equilíbrio ou limitar a disseminação de populações de micro-organismos com propriedades patogênicas. O componente celular da resposta inata apresenta receptores dispostos de maneira diferencial nas populações celulares, que podem detectar os micro-organismos ou produtos de destruição de células do hospedeiro, ativando a função efetora das células da imunidade inata. (128)

As células dendríticas (DCs), monócitos e macrófagos são parte do componente celular da resposta inata e estão localizados nos limites corpóreos com o ambiente externo, como mucosas e epitélios. Frente ao perfil patogênico de micro-organismos, essas células são ativadas e são capazes de apresentar antígenos característicos desses patógenos para elementos celulares da resposta imunológica adaptativa, que respondem de maneira mais precisa ao componente patogênico. Com o auxílio de mediadores solúveis como quimiocinas e citocinas e também de moléculas expressas na superfície dessas células, a resposta inata modela a resposta imunológica mais específica. (129)

Existe uma profusa intercomunicação nas células da imunidade inata. Por exemplo, as células dendríticas produzem mediadores solúveis, como os interferons, as citocinas e as quimiocinas, que ativam outras células no local da infecção como as células *Natural Killer* (NKs). Essas células são capazes de reconhecer especificamente as células infectadas, num processo que pode culminar na eliminação destas células invadidas. No contexto de uma infecção viral, as propriedades patogênicas dos vírus podem estimular a resposta dos elementos da resposta inata, tanto com a produção dos mediadores solúveis, quanto com funções

efetoras celulares, mas também é capaz de estabelecer uma infecção ativa perturbando a homeostasia. (66)

### **1.2.1 As células dendríticas plasmacitoides**

As células dendríticas plasmacitoides – PDCs – foram descritas efetivamente há 30 anos em razão de sua robusta e rápida capacidade produtiva de interferons do tipo I (130, 131). Posteriormente, essa característica foi atribuída à expressão intracelular de TLR7 e TLR9 (receptores do tipo Toll), cujos ligantes são ácidos nucleicos. As PDCs também são consideradas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) críticas para o desenvolvimento da resposta adaptativa (115). Frente à perturbação da homeostasia e dependendo do microambiente de mediadores solúveis, as PDCs podem induzir tanto a imunidade, quanto a tolerância das células T e outras populações celulares (132). As PDCs participam na fase precoce da resposta antiviral, podendo ser localizadas nos locais de agressão ativa, promovendo a inflamação. Através da produção de quimiocinas/citocinas ou através do contato intercelular, as PDCs modulam o papel de outras células da resposta inata, como células dendríticas mieloides (MDCs) e células NK. (133)

#### ***Populações e distribuição das PDCs***

As PDCs são consideradas subpopulações de células dendríticas, porque são capazes de apresentar antígenos para células T e de sofrer um processo de maturação semelhante às MDCs. Morfologicamente, as PDCs são células arredondadas com retículo plasmático rugoso proeminente, similar aos plasmócitos secretores de anticorpos. (134) Fenotipicamente, as PDCs humanas não expressam marcadores de linhagens clássicas de células B (imunoglobulina de superfície e CD19), células T (TCR e CD3), monócitos (CD14) e células NK (CD56 e CD16) (135). Os marcadores mieloides CD11c, CD11b, CD13 e CD33 não estão presentes na superfície das PDCs (136). As MDCs circulantes compartilham algumas moléculas de superfície com as PDCs como o CD4, os antígenos de MHC de classe II (HLADR<sup>+</sup>) e o receptor de IL3 ou CD123, embora para essa última molécula ocorra uma maior expressão em PDCs (CD123<sup>high</sup>). Em condições homeostáticas, as PDCs

são a única população celular que expressam a neuropilina-1 ou BDCA-4 (antígeno de célula dendrítica do sangue 4) dentre as células circulantes. (137) Até o momento, foram descritas apenas duas moléculas exclusivas das PDCs: a proteína BDCA-2, que é uma lectina do tipo C reconhecadora de padrões moleculares de patógenos, e a proteína ILR7 (transcrito similar a imunoglobulina 7). Ambas as moléculas estão envolvidas na modulação da produção de IFN tipo I (138-140).

Além de diferenças fenotípicas, as PDCs e as MDCs também apresentam distribuição tecidual diversa. As MDCs são amplamente distribuídas pelo organismo, podendo ser células residentes em tecidos periféricos não-linfoides (141). Por outro lado, em condições homeostáticas, as PDCs raramente são encontradas em tecidos não-linfoides (142). As PDCs representam 0,2% a 0,8% dos leucócitos circulantes, e nas áreas ricas em células T dos órgãos linfoides podem ser 20% da população total de células MHC classe II positivas (143). As MDCs e PDCs diferem também nos padrões migratórios em relação aos linfonodos proximais. As MDCs chegam aos linfonodos via linfáticos aferentes, enquanto PDCs utilizam as veias de endotélio alto (HEV) e as moléculas CD62L e CCR7 para recircular para os linfonodos (144-146). Entretanto, durante condições patológicas, as PDCs são encontradas em tecidos como em pulmões infectados com influenza ou vírus sincicial respiratório (RSV) (147), em mucosa vaginal infectada com vírus herpes simplex (148), e na pele durante a infecção por vírus varicela zoster (149). Também podem ser encontradas em tecidos durante diversas condições autoimunes, como psoríase (150) e lúpus (151). As PDCs podem migrar para inflamações periféricas, através da expressão dos receptores de quimiocinas CXCR3, CXCR4 e CMKL1 (152).

### *Reconhecimento de antígenos pelas PDCs*

Os antígenos encontrados pelas PDCs podem ser internalizados e desencadear a ativação das funções efetoras dessas células. Uma menor capacidade em realizar a fagocitose e a macropinocitose é observada nas PDCs em comparação às MDCs (153). Assim, a internalização antigênica é majoritariamente via endocitose mediada por receptor nas PDCs, em razão de seu variado repertório de receptores endocíticos, presentes na superfície celular. Os membros da família

dos receptores da porção Fc de anticorpos e das lectinas do tipo C compõem a gama de moléculas internalizadoras de antígenos.(136).

Os receptores Fc que são expressos nas PDCs incluem: FcγRIIIa (CD32), FcαR e FcεRI, sendo que FcγRI (CD64) e FcγRIIIa/b (CD16) não são expressos nas PDCs. Os receptores Fc medeiam a internalização de antígenos solúveis adsorvidos por anticorpos específicos ou antígenos em imunocomplexos (154, 155). A internalização via FcγRIIIa (CD32) resulta na redistribuição das moléculas apresentadoras de antígenos MHC tipo I e II do compartimento lisossomal para a membrana plasmática, aumentando a capacidade de apresentação antigênica das PDCs (156, 157). Por outro lado, na internalização via FcεRI observa-se um perfil imunorregulador com a diminuição da produção de IFNα (158). Os receptores lectina tipo C presentes nas PDCs são BDCA-2, DCIR (receptor imunológico de células dendríticas) e DEC-205. Como já descrito, BDCA-2 é marcador exclusivo de PDCs imaturas e durante a ativação/maturação das PDCs ocorre a diminuição da sua expressão (159). Além disso, a captura de antígenos via BDCA-2, desencadeia, com auxílio de FcεRI a inibição da produção de IFNα (160). De maneira interessante, DCIR e DEC-205 também inibem a produção de IFNα quando ativados. Mesmo possuindo função regulatória, esses receptores têm expressão diminuída frente a ativação das PDCs, (161, 162). Recentemente foi demonstrado que o oligonucleotídeo CpG classe B é endocitado via DEC-205 (163).

### **Receptores TLR intracelulares das PDCs**

A expressão de receptores de padrões moleculares no sistema endossomal das PDCs contribui para o reconhecimento da atividade patogênica, levando a ativação da função efetora dessa população celular. Os receptores do tipo Toll (TLRs) são receptores intracelulares ou membranares que fazem parte da família de receptores (PRRs), juntamente com outros membros da classe dos receptores imunológicos, como os receptores do tipo NOD (NLR), e os receptores similares a RIG (RLH). Esses receptores reconhecem assinaturas moleculares únicas de micro-organismos (PAMPs), estruturas essas amplamente representadas entre os táxons microbianos. Muitos patógenos ativam, de maneira redundante, esses receptores, reafirmando a importância dos PRRs no equilíbrio da homeostasia. De fato, mutações em genes TLR em humanos causam aumentada suscetibilidade a diversos agentes patogênicos. (164) Os TLRs são glicoproteínas compostas de uma parte extracelular com repetições ricas em leucina que se ligam aos PAMPs, e de

uma parte intracelular que possui um domínio TIR (domínio de receptor citoplasmático de receptor de IL1/Toll), transdutor de sinal. Os TLRs extracelulares em humanos são TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 e os TLRs intracelulares são TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9. Os TLRs intracelulares reconhecem ácidos nucleicos e a sua posição intracelular dificultaria o reconhecimento de ácidos nucleicos do hospedeiro. Ainda, a ativação desses TLRs é sensível ao pH e à atividade enzimática, evidenciando a compartimentalização da sinalização desses receptores. (165)

O TLR9 reconhece a fita dupla de DNA (dsDNA), podendo ser ativado por DNA bacteriano, viral e de parasitos (166, 167). Os oligonucleotídeos sintéticos – CpG – contêm motivos que estimulam a ativação de TLR9. Quatro classes de diferentes de CpG – CpG-A, CpG-B, CpG-C e CpG-P – ligam-se ao TLR9, levando a distintas funções biológicas. Em PDCs, CpG-A é um potente indutor de IFN $\alpha$ , CpG-C e CpG-P também podem levar a produção da citocina. Por outro lado, CpG-B é um fraco indutor de IFN $\alpha$ , porém eficiente em induzir a expressão de moléculas de maturação nas PDCs (168). Entretanto, investigações sugerem que a localização da ativação de TLR9 na rede endossomal seria mais importante que a estrutura do DNA reconhecida (169, 170).

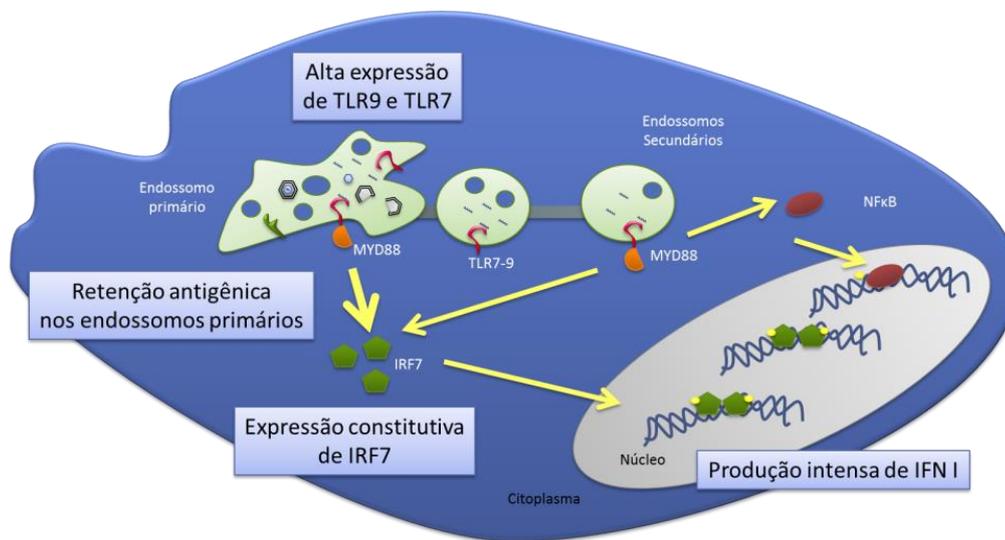
O TLR7 reconhece RNA de fita simples (ssRNA), enquanto TLR3 reconhece RNA de fita dupla (dsRNA) e acredita-se que ssRNA sejam agonistas de TLR8 (171). O TLR7 pode ser ativado por derivados imiquidazoles (R848 e imiquimod), análogos de loxoribina. De modo geral, ssRNA ricos em guanosina e uridina, poliuridinas sintéticas e também RNA liberados no fagolisossomos ativam o TLR7 (172). O TLR3 também pode ser ativado pelo análogo sintético do ácido poli inosínico poli citidílico (poli I:C) (173). O TLR8 pode ser ativado por RNA bacteriano (174). Diversos vírus podem ser reconhecidos pelo TLR7, como HIV (175), influenza (176) e flavivírus (74).

Os TLRs intracelulares estão localizados nos endossomos, mas também no retículo endoplasmático (RE) e nos lisossomos (177). A ativação dos TLRs é dependente da acidificação dos endossomos. Além disso, no caso de TLR9, ocorre uma proteólise do receptor, que é fundamental para a ligação com o DNA (178-180). De maneira interessante, em PDCs, o reconhecimento de moléculas ocorre nos endossomos primários em comparação com os outros tipos celulares, onde ficam

retidos os agonistas de TLR9 por um longo tempo. O CpG-A é retido e reconhecido em endossomos primários, enquanto o CpG-B prossegue para endossomos secundários. Sugere-se que a localização endossomal diferencial dos diferentes tipos de CpG seja a razão das diferentes funções efetoras observadas para cada um dos estimuladores (181, 182).

Os TLRs 7 e 9 ativados desencadeiam a fosforilação de diversas moléculas adaptadoras eventos esses que culminam na translocação para o núcleo de fatores de transcrição. Em PDCs, essa sinalização é considerada especial, pois recruta diferentes moléculas, quando comparada com DCs e macrófagos. A sinalização de TLR7 e TLR9 é bastante similar: ambos os receptores recrutam a molécula adaptadora MYD88, como quase todos os TLRs, sendo a exceção o TRIF que é recrutado por TLR3. MYD88 recruta IRAK4 que, em MDCs, culmina na ativação de dois fatores de transcrição responsáveis pela transcrição de citocinas pró-inflamatória: AP-1 e NF $\kappa$ B. No caso das PDCs, nos endossomos primários, IRAK4 desencadeia a ativação de IRF7, fator de transcrição de IFN $\alpha$ . Entretanto, a sinalização desencadeada por TLR7/9 nos endossomos secundários é similar à sinalização encontrada em MDCs. (152, 165)

A expressão constitutiva de IRF7 é importante para a intensa produção de IFN $\alpha$  pelas PDCs. Uma explicação plausível é que o complexo ativado pela sinalização TLR7 e 9 pode ser rapidamente montado (183). As MDCs não expressam IRF7 constitutivamente, porém a transcrição do gene do IRF7 é resultado da sinalização via receptor de IFN $\alpha$  (IFNAR) (184). Essa retroalimentação positiva da produção de IFN $\alpha$  via IFNAR também está ativa nas PDCs (185).



**Figura 1.2: Reconhecimento de antígenos pelas PDCs.**

As PDCs possuem habilidades que contribuem para a rápida ativação frente ao antígeno, que podem ser retidos por mais tempo nos endossomos primários. Esses compartimentos contêm uma elevada expressão de TLRs virais em comparação a outros tipos celulares. Além disso, a expressão constitutiva de IRF7 desencadeia a sinalização provenientes dos TLRs endossomais de maneira rápida, promovendo a intensa produção de IFNs do tipo I.

Desse modo, sugere-se que a habilidade ímpar de produção robusta de IFN $\alpha$ , pelas PDCs, em resposta a presença de ácidos nucleicos (Figura 1.2) seja intrinsecamente ligada a 1) alta densidade de receptores TLR7 e TLR9 nos seus endossomos, 2) a capacidade de reter antígenos na sua rede endossomal e 3) a expressão constitutiva do fator de transcrição de IFN $\alpha$  (IRF7) nesse tipo celular (152).

### ***Ativação das PDCs***

As PDCs podem se tornar imunoestimulatórias pela presença de patógenos ou pelo seu perfil patogênico (citocinas, quimiocinas e moléculas de patógenos presentes no microambiente), processo esse chamado classicamente de maturação. As ações efetoras imunoestimulatórias das PDCs são caracterizadas pela intensa produção de mediadores solúveis e pela sua capacidade em apresentar antígenos, regulando positivamente as células T, o que promove a ligação entre as respostas da imunidade inata e da adaptativa. (132)

As PDCs teriam menor capacidade de apresentação antigênica via MHC de classe II que as MDCs, em razão da constante reciclagem do complexo antígeno:MHC entre a membrana superficial e os endossomos (186). A função

estimulatória ou tolerogênica das PDCs é resultado também da presença de moléculas membranares durante o contato intercelular, e das citocinas produzidas pelas PDCs. O balanceamento na expressão de moléculas como as da família B7 (CD80, CD86, ICOSL, PD-L1), e da superfamília do TNF (CD40, OX40L, TRAIL) é impactante no perfil da resposta T gerada (187). As PDCs podem modelar o perfil de resposta T (Th1, Th2, Th17 ou Treg) (188, 189). Por exemplo, ICOSL (ligante induzido coestimulador de células T), que se liga a ICOS em células T, foi responsável pela indução da produção de IL10 pelas células T, sugerindo um papel na diferenciação de células Treg e por consequência, na regulação das respostas imunológicas (190, 191). O PD-L1 (ligante de morte programada 1) pode ser expresso em PDCs (192) e sugere-se sua função na anergia das células T (193). O receptor OX40L poderia contribuir na geração de células T com perfil Th2 (194). A produção de IFNs do tipo I é responsável pela indução de um perfil Th1 pelas células TCD4 (194), pois aumenta a expressão de IL12R (195). Além disso, IFN do tipo I promovem a apresentação cruzada em MDCs (196) e a sobrevivência de TCD8 citotóxicas (197).

A ativação das PDCs desencadeia a produção de vários mediadores solúveis. As PDCs produzem as quimiocinas CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4 e CCL5 (198). As citocinas produzidas pelas PDCs incluem níveis moderados de IL6 e TNF $\alpha$ , pequenas quantidades de IL-12, mas principalmente robusta produção de interferons do tipo I (136).

Apesar de sua baixa frequência no sangue periférico, as PDCs são responsáveis por mais de 95% da produção de interferons do tipo I frente ao antígeno viral, por exemplo. Além disso, durante as primeiras horas de ativação, as PDCs dedicam 60% do transcriptoma da ativação para os genes do IFN do tipo I, produzindo 200 a 1000 vezes mais IFNs que qualquer outro tipo celular (130). As PDCs humanas expressam quase todos os tipos de IFN tipo I (199). Por todas essas características, as PDCs são chamadas também de IPCs ou células produtoras de IFN do tipo I. Uma vez que os interferons do tipo I são capazes de ativar várias células da resposta imunológica, a sua produção é altamente regulada nas PDCs. De fato, diversos receptores na membrana das PDCs podem diminuir a expressão de IFNs do tipo I. A ligação de ILT7, Fc $\epsilon$ R1a e BDCA2 desencadeia uma sinalização ativadora via Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  modula diretamente a sinalização TLR7/9, diminuindo a produção de IFN do tipo I (200).

Os interferons foram descobertos por causa de sua capacidade em inibir a replicação do vírus influenza em culturas celulares (201). Existem três classes de interferons (I, II e III) e todas possuem funções antivirais. Os interferons (IFN) do tipo I (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\omega$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$ ) são citocinas altamente pleiotrópicas, cujos membros mais representativos são os IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ . Existem 13 subtipos de IFN $\alpha$  e apenas um gene codifica o IFN $\beta$ . Quase todas as células do corpo são capazes de produzir e responder aos interferons do tipo I (202). A ativação do receptor composto pelo heterodímeros entre IFNAR1 e IFNAR2 desencadeia a fosforilação de JAK1 (Quinases Janus) e Tyk2, que promovem o recrutamento dos STATs (transdutores de sinais e ativadores da transcrição) para a cauda dos IFNARs. Desse modo, os STATs recrutados podem ser fosforilados por JAK1, formam dímeros e se direcionam ao núcleo da célula. Os STATs 1 e 2 são os principais mediadores da sinalização de IFN do tipo I. O heterodímero se associa a IRF9 e, formando o complexo transcripcional ISGF3, que vai para o núcleo da célula no promotor dos ISRE (elementos de resposta estimulados pelos interferons). O STAT4 é necessário para a indução de IFN $\gamma$  mediada por IFN $\alpha/\beta$ -IFNAR, enquanto o STAT1 bloqueia essa via. A ativação de IFNARs também pode desencadear a ativação de SOCS (supressores da sinalização de citocinas) que desfosforilam JAK1 ou os sinalizam para via de degradação, o que é fundamental para a regulação do sinal da via dos IFN do tipo I (203, 204).

Na resposta imunológica antiviral, os IFN do tipo I tem funções autócrinas e parácrinas que levam a resistência celular à infecção. De um modo geral, os IFNs induzem cerca de 500 a 1000 genes nas células estimuladas. A nível celular, observa-se a transcrição de diversos genes estimulados por interferons (ISGs), como RNaseL, Mx, OAS, genes da família do IFIT e da família IFITM. Alguns desses genes são estritamente regulados via IFNARs, entretanto outros podem ser estimulados também pela ativação de outros IRFs ou outros PRRs. (205)

A Mx é uma GTPase que captura proteínas do capsídeo viral inibindo a montagem dos vírions. A RNaseL atua juntamente com a OAS, pois OAS converte ATP em oligômeros de adenosina e estes possibilitam a dimerização de RNaseL, um degradador de RNA viral. A PKR (proteína quinase dependente de RNA) fosforila o eIF $\alpha$  (fator de iniciação eucariótico alfa) que acaba por inibir a tradução gênica viral (206). A família das IFITs (proteína induzida por IFN com repetições tetratricopeptídeos), que inclui IFIT1, IFIT2 e IFIT3, atua suprimindo a iniciação da

tradução (bloqueando eIF3), ligando-se a RNA viral descapecado ou com a capa incompleta e sequestrando RNA ou proteínas virais do citoplasma. A família das IFITMs (proteínas transmembranas induzidas por IFN) inclui IFITM1, IFITM2, IFITM3 e IFITM5 e tem sua expressão aumentada pelos IFNs, inibindo a adsorção/fusão viral nas células-alvo (207).

O TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral) não é estritamente um ISG, porém sua expressão está relacionada com a resposta antiviral e estimulação por IFN $\alpha$ . A função do TRAIL será discutida, porém ressaltamos aqui sua função em induzir a apoptose em células infectadas, colaborando para a imunidade antiviral. (208)

As citocinas produzidas por PDCs, principalmente os IFNs do tipo I, podem estimular a função de monócitos e macrófagos residuais. Os IFNs do tipo I estimulam a diferenciação de monócitos em células dendríticas, o aumento da apresentação antigênica, o aumento da fagocitose via receptores FcR, o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento do “burst” respiratório através da expressão da enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzida) (204, 209). Além disso, o IFN I sistêmico atua na medula óssea, promovendo a migração de monócitos para as áreas de agressão ativa (210). Os IFNs do tipo I produzidos pelas PDCs são estimuladores da citotoxicidade celular das células NK, colaborando também para a expressão do marcador de ativação CD69 e produção de IFN $\gamma$  (211, 212). As células NK também podem modular a produção de IFN $\alpha$  pelas PDCs, através da produção de IL2, MIP1 $\beta$  e também pela ligação da molécula LFA-1(212, 213). Por causa de sua ação pleiotrópica, a terapia com IFN $\alpha$  é amplamente utilizada contra tumores sólidos e hematológicos, esclerose múltipla e hepatites crônicas (204).

### **IKPDCs: as PDCs “killer” produtoras de IFN do tipo I**

Além da capacidade estimulatória de células da imunidade, as células dendríticas humanas podem adquirir uma função “Killer” contra células tumorais e infectadas e também podem ser chamadas de KDCs (214). Por exemplo, MDCs CD11c+ estimuladas com IFN $\alpha$  ou IFN $\gamma$  foram capazes de induzir a morte de células tumorais por mecanismo dependente do ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) (215). No casos das MDCs, foi relatado também que o TNF $\alpha$  e as perforinas/granzimas podem mediar a morte de células tumorais

quando estimulados com lipopolissacarídeo ou IFN $\gamma$  (216, 217). No caso das PDCs, vírus ou agonistas dos receptores TLR7/9 induzem a expressão de TRAIL nessa população (217). As PDCs que exibiam TRAIL na superfície celular foram capazes também de produzir quantidades robustas de IFN $\alpha$  e de induzir a morte de células tumorais (218) e células infectadas (219, 220). Por essas características, elas são chamadas de PDCs “killers” produtoras de IFN do tipo I ou IKPDCs, cujo principal mecanismo antiviral é a produção de IFN $\alpha$  e principal mecanismo citotóxico mediado pelo TRAIL da superfície membranar.

O TRAIL é uma molécula que apresenta homologia com a família do TNF (221, 222) e sua característica marcante é a indução de morte celular seletivamente em células tumorais ou infectadas (223). Além das PDCs e MDCs, as células NK (224), os linfócitos B (225), os monócitos (226) e os neutrófilos (227) podem expressar TRAIL após estimulação direta com antígenos ou indireta com citocinas. O TRAIL possui cinco receptores descritos, sendo dois com funções pró-apoptóticas (TRAIL-R1 ou DR4 e TRAIL-R2 ou DR5), dois sem funções apoptóticas ou receptores “decoy” (TRAIL-R3 e TRAIL-R4) e um receptor solúvel envolvido na reabsorção óssea (osteoprotegerina ou OPG) (223, 228-231). O TRAIL pode ser observado tanto na forma solúvel (TRAILs) quanto na membrana celular (TRAILm) e ambas as formas são biologicamente ativas. Os homotrímeros de TRAIL se ligam a homotrímeros dos receptores de morte desencadeando a sinalização (232). Assim como os IFN do tipo I, o TRAIL é uma citocina pleiotrópica e é altamente regulada por causa de seu potencial apoptótico. Os IFNs tanto de tipo I quanto de tipo II podem induzir a expressão de TRAIL. Nesse caso, os fatores de transcrição STAT1 e IRF1 parecem ter papel importante na transcrição de TRAIL (233). O IFN $\gamma$  e a IL18 podem induzir a expressão de TRAIL em monócitos e células NK, respectivamente (226, 234). Os IFN do tipo I parecem induzir uma maior expressão do gene TRAIL quando comparados à IFN $\gamma$  (208), induzindo uma robusta expressão de TRAIL em macrófagos (235) e em células T CD4 e CD8 ativadas (236).

Os receptores TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 ativados recrutam domínios de morte associados ao FAS (FADD) e procaspase-8, formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). A caspase-10 também é recrutada para o DISC e é ativada na mesma proporção que caspase-8. A proteína anti-apoptótica c-FLIP regula ativação das caspases, competindo pela ligação em FADD. Na ausência de c-FLIP, a caspase-8 desencadeia a ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7, induzindo a

apoptose pela via extrínseca. (237) As células que são suscetíveis a apoptose por essa via são chamadas células tipo I. Em células do tipo II, ocorre a necessidade da ativação da via intrínseca em que a caspase-8 cliva também Bid para formar tBid, que, interagindo com Bax e Bak na membrana mitocondrial, promove a liberação de citocromo c. Essa molécula vai se ligar ao fator ativador da peptidase apoptótica (Apaf-1) e à caspase-9, formando o apoptossoma, que inicia a cascata das caspases. A permeabilização da membrana mitocondrial também libera Smac/DIABLO que inibe XIAP, permitindo a completa ativação das caspases efetoras (238).

Os fatores que induzem a expressão de TRAIL-R não são completamente elucidados. Sugere-se que os receptores “decoy” participem na regulação da ativação dos receptores de morte interceptando o sinal de morte à nível de membrana. O TRAIL-R3 na membrana sequestraria o ligante disponível e/ou o TRAIL-R4 formaria heterotrímeros com TRAIL-R1 ou TRAIL-R2, impedindo a transdução do sinal apoptótico (238). A atividade tumoricida do TRAIL revelou a expressão diferencial de TRAIL-R em diversas células transformadas, em seguida foi observada também a modulação em células infectadas (239).

Em infecções virais, observou-se que a proteína viral gp120 pode induzir o aumento da expressão de TRAIL-R2 tanto em células T infectadas quanto em células T não infectadas (240). Essas células são sensíveis a morte via TRAIL e esse mecanismo pode contribuir para a clássica depleção TCD4 relatada nos casos de AIDS. A infecção pelo HCMV aumenta a expressão de TRAIL-R1 e TRAIL-R2 em fibroblastos infectados tornando-os suscetíveis a apoptose via TRAIL, sendo que os fibroblastos não infectados diminuem a expressão dos receptores de morte, tornando-se refratários a apoptose em mecanismo mediado por IFN $\gamma$  (241). As células infectadas pelo HCV também exibem aumento de TRAIL-R1 e TRAIL-R2, são sensíveis a apoptose via TRAIL, mas podem ser suscetíveis a ação antiviral do IFN $\alpha$  (242). O flavivírus WNV (vírus do oeste do Nilo) replica em neurônios, desencadeando o aumento da expressão de TRAIL-R2 nas células infectadas, tornando-as suscetíveis à apoptose mediada por células T CD8 TRAIL<sup>+</sup> (243). Assim, sugere-se que o TRAIL e seus receptores podem representar um mecanismo importante na resposta às infecções virais e sua desregulação pode impactar negativamente nos mecanismos citotóxicos e também antivirais da resposta imunológica.

## *As PDCs na imunidade antiviral*

Sabe-se que a depleção de PDCs em modelos murinos resulta em um aumento na carga viral durante o estabelecimento da infecção (244). Recentemente, observou-se que a resposta insuficiente de PDCs nas fases precoces do desenvolvimento, acarreta numa produção diminuída de IFNs do tipo I, tornando os camundongos mais suscetíveis a infecções virais (245). Apesar de existirem diferenças fundamentais entre as PDCs murinas e as humanas, essas investigações reforçam a importância das PDCs e da sua função efetora durante as infecções virais. De fato, em diversas infecções virais, observam-se estratégias de inibição das respostas antivirais, sendo uma delas o bloqueio de funções efetoras das PDCs.

Uma forma clássica de escape viral consiste na subversão das funções das células infectadas e levando à apoptose dessas células por exaustão. Entretanto, mesmo que alguns vírus consigam ultrapassar a proteção da resposta de IFNs do tipo I, nas PDCs, a infecção não parece ser produtiva. As PDCs podem colaborar para a disseminação viral do HIV carregando partículas virais para as áreas ricas em células T (246). O genoma do HCV foi detectado em PDCs de pacientes crônicos (247). O HCMV também pode infectar PDCs, porém com baixa eficiência (248).

A inibição da produção de IFNs do tipo I pelas PDCs é considerada outra forma de escape viral. Por exemplo, a proteína gp120 e tat do HIV são capazes de inibir a produção de IFNs do tipo I pela ligação com a molécula de superfície BDCA2, CD4 e proteínas ligantes de manose (249-251). A proteína HBsAg do HBV também é capaz de inibir a produção de IFN em PDCs estimuladas pelas via do TLR9 (252, 253). A proteína E2 do HCV pode modular a produção de IFN $\alpha$  nas PDCs, em mecanismo dependente da ligação às moléculas CD81 e BDCA2 (254, 255).

Através da inibição da função imunoestimulatórias das PDCs, a replicação viral pode interferir na geração de respostas antivirais eficientes. Por exemplo, o HBV interfere na interação entre células NK e PDCs, bloqueando a produção de IFN $\gamma$  das células NKs durante a cocultura com PDCs (256). O HBV também interfere na expressão de moléculas de maturação e na produção de outras citocinas como TNF $\alpha$  (253). O HIV promove a indução da enzimaIDO nas PDCs, cujo mecanismo imunorregulador é limitante para a proliferação de células T (257). Além disso,

observou-se que proteínas do HIV afetam o papel imunoestimulador das PDCs em induzir a produção de IFN $\gamma$  pelas células NK (258) e em auxiliar a proliferação e produção de IgG e IgM por células B (250). As PDCs de pacientes HCV positivos não estimulam a proliferação ou produção de IFN $\gamma$  pelas células TCD4 (259) e não são capazes de expressarem moléculas de maturação e TRAIL frente células infectadas (260). De fato, proteínas virais do HCV podem bloquear também a maturação das PDCs o que explicaria a diminuição da capacidade imunogênica dessas células (254).

Não somente as vias de produção de IFNs, mas também os efetores de sinalização dos IFNs do tipo I sofrem a interferência viral. Por exemplo, o vírus SARS-CoV pode inibir a fosforilação de IRF3, IRF7 e STAT1, impedindo a transdução do sinal dos IFNs do tipo I nas células alvo (261-263). Os vírus Influenza A, HSV e HCV inibem os genes estimulados por interferon: PKR e a OAS/RNase L (264-267).

Atualmente, o papel das PDCs na imunopatogenia de infecções virais é pouco estudado. No caso do HIV, apesar das PDCs contribuírem para a resposta antiviral, inibindo a replicação, a desregulação da função efetora dessas células durante a infecção, pode contribuir para tanto para a imunoativação quanto para a imunossupressão (268). Por exemplo, durante a infecção, os números das PDCs estão reduzidos no sangue periférico (269, 270), sugerindo que as PDCs morrem ou migram para os linfonodos (271). Sabe-se que o HIV desencadeia uma maturação parcial dessas células, mas induz a produção de grandes quantidades de IFN $\alpha$  (272, 273). Além disso, o HIV estimula a transformação das PDCs em IKPDCs (219). A intensa produção de IFN $\alpha$  por PDCs de mulheres foi correlacionada com a progressão da doença (274), sugerindo que as PDCs podem estar contribuindo para uma das características chave do HIV: a depleção de células T CD4. Cronicamente, o IFN $\alpha$  levaria a um quadro de apoptose das células T não infectadas, apoptose essa que também seria exacerbada pelas IKPDCs, uma vez que tanto as células T infectadas quanto as não infectadas expressam o TRAIL-R na membrana. De fato, investigações com pacientes controladores da infecção demonstram que as IKPDCs circulantes apresentam-se em menor frequência quando comparadas as IKPDCs dos indivíduos virêmicos (275). Além disso, os números das PDCs nos pacientes controladores foram semelhantes aos controles saudáveis (220). O HIV também interfere nas funções imunoestimuladoras das PDCs, pois as PDCs de pacientes

virêmicos não são capazes de induzir citotoxicidade ou produção de IFN $\gamma$  em células NK autólogas (276). O papel das PDCs na imunopatologia do HIV ainda é objeto de intenso debate, mas sugere-se que a sua perda de função ou função alterada seja associada com a progressão da doença (277).

No caso das Hepatites virais C e B, observa-se um fenótipo imunorregulador das PDCs nos casos crônicos, evidenciado pelos menores números de PDCs circulantes tanto para HBV quanto para HCV (278-281). Além disso, semelhante ao HIV, observa-se expressão aumentada de marcadores de imunomodulação, como o PDL1 (278, 282, 283). Ao contrário do HIV, ambos HCV e HBV não são capazes de induzir uma intensa resposta de IFNs do tipo I durante estimulação *in vitro* das PDCs (281, 283, 284). No caso do HBV, sugere-se que a diminuída expressão de TLR9 nas PDCs acarretaria na ineficiência da resposta de IFNs do tipo I (281, 285). Confirmando a relação entre as funções das PDCs e a redução da morbidade, após tratamento com telbivudina para HBV ou interferons/ribavirina para HCV, os números de PDCs circulantes se igualaram aos dos controles saudáveis (278, 286). De fato, no HBV, a diminuição da carga viral foi correlacionada com os aumentos dos números de PDCs no sangue periférico (287). A citotoxicidade de células NK estimuladas por PDCs de pacientes HBV também se demonstrou falha (288).

### **As PDCs durante a imunopatologia da dengue**

São poucos os relatos sobre o envolvimento das funções efetoras das PDCs na imunopatologia das infecções por flavivírus. Investigações *in vitro* apontam que DENV e WNV, não parecem serem capazes de infectar esse tipo celular (90, 289). Porém é conhecida a interferência por proteínas virais nas vias de sinalização dos interferons de tipo I, através da fosforilação de STATs e outras moléculas de sinalização em células infectadas (290, 291), característica que parece ser conservada entre os flavivirus, como WNV, YFV, Kunjin, JEV e TBEV (292). Sabe-se que os flavivírus como WNV, DENV, YFV podem promover a produção de IFNs do tipo I pelas PDCs (74, 289), fator esse considerado antiviral durante modelos *in vitro* (293).

Durante o estabelecimento da infecção pelo DENV, a frequência das PDCs circulantes tanto em crianças (119), quanto em adultos (120) foi inversamente proporcional a gravidade ou a carga viral. Entretanto, apenas uma investigação descreve a correlação entre a detecção de moléculas imunoestimulatórias em PDCs

com os quadros clínicos da dengue (77). Até o momento, a descrição de IKPDCs durante a dengue não havia sido caracterizada. As propriedades antivirais tanto dos IFN do tipo I (293) quanto do TRAIL (117) favorece a importância do estudo dos mecanismos efetores das IKPDCs para a imunopatogenia. A função antiviral e/ou citotóxica das IKPDCs contra as células alvo pode ser um mecanismo que favoreça o clearance viral, restringindo a disseminação da replicação viral durante a fase aguda da doença.

## 1.2.2 As células Natural Killer

As células *Natural Killer*, descobertas há mais de 30 anos, são linfócitos efetores da resposta imunológica inata, capazes de reconhecer e eliminar células tumorais e infectadas (294-296). As células NK apresentam uma ampla gama de receptores que reconhecem múltiplos ligantes nas células alvo, cuja sinalização ativadora e/ou inibitória desencadeia uma função efetora, caracterizada pela citotoxicidade e produção de IFN $\gamma$  (121). Além da ativação direta pelas células alvo, as células NK podem ser ativadas por mediadores inflamatórios produzidos durante a inflamação, respondendo indiretamente ao estabelecimento da infecção. Por essas características, a ativação das células NK resulta em respostas imunológicas inatas rápidas, colaborando para a detecção e eliminação eficiente de um determinado perfil patogênico perturbador da homeostasia (297).

### *Populações e distribuição de células NK*

As células NK humanas constituem uma população heterogênea de linfócitos CD3 negativos e são delineadas pela expressão relativa na superfície membranar de duas moléculas principais: CD56 ou molécula de adesão neural (NCAM-1) e CD16 ou receptor de baixa afinidade de Imunoglobulina gama (FcR $\gamma$ III) (298). Recentemente, a literatura aponta o receptor NKp46 como marcador universal de células NK (299), porém o mesmo pode ser encontrado também em populações de células linfoides inatas (ILCs – “Innate Lymphoid Cells”) em tecidos de mucosa (300) e em alguns linfócitos ativados (301). Tradicionalmente, as subpopulações de células NK expressam diferentes densidades das moléculas CD56 e CD16 em sua

superfície. São distintas populações *bright* ou forte, *dim* ou fraca ou negativas para os marcadores em questão. Nesse contexto, as células NK circulantes podem ser divididas em 5 populações: 1) CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup>; 2) CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup>; 3) CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-</sup>; 4) CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> e 5) CD56<sup>-</sup> CD16<sup>bright</sup>. Cerca de 90% das células NK circulantes são CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup>, enquanto as 10% restantes são CD56<sup>bright</sup>. Dessas, 50 a 70% são CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> e 30 a 50% são CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> (302). As outras subpopulações são minoria em pessoas saudáveis, mas podem estar em números aumentados em condições patológicas (303).

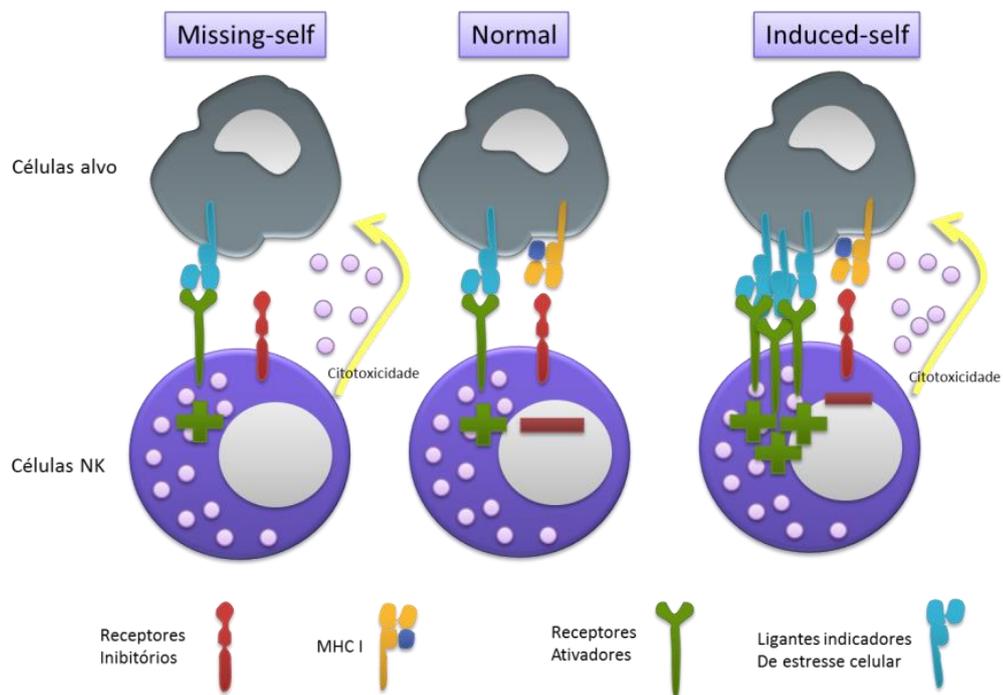
As subpopulações de células NK estão distribuídas diferencialmente no intestino e pele saudáveis, nos pulmões e nos tecidos linfoides. No fígado, representam 30 a 40% dos leucócitos mononucleares, sendo a maioria CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> (304). As células NK são encontradas no baço (7 a 50% dos leucócitos mononucleares) e na circulação sanguínea (uma média de 10%), sendo que 85 a 95% das células NK totais são a subpopulação CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup>. Os linfonodos apresentam 40% de todos os linfócitos do corpo (comparando-se aos 2% circulantes), em que 1 a 7% dos leucócitos mononucleares são células NK e 75% são CD56<sup>bright</sup>. Desse modo, os linfonodos representam o maior reservatório de células NK do organismo. Em geral, a maioria das células NK circulantes é CD56<sup>dim</sup>, enquanto a maioria das células NK nos linfonodos são CD56<sup>bright</sup> (305). Fenotipicamente, as células CD56<sup>bright</sup> expressam altas densidades de moléculas de adesão como CD62L, CD49e, CD54 e dos receptores de quimiocina CCR7 e CXCR3, que permitem a recirculação para os tecidos linfoides secundários. Já as células NK CD56<sup>dim</sup> expressam receptores para quimiocinas expressas em tecidos inflamatórios como CXCR1 (ligante IL8) e CCR2 (ligante MCP-1) (302).

### ***Reconhecimento das células alvo pelas células NK***

As células NK expressam uma enorme diversidade de receptores de superfície, que não sofrem rearranjo gênico e que podem ser ativadores ou inibidores da citotoxicidade (121). Em geral, os receptores ativadores reconhecem ligantes exógenos ou endógenos expressos em células anormais, enquanto os receptores inibitórios reconhecem majoritariamente as moléculas de MHC de classe I clássico e não clássicos expressos nas células alvo. A resposta efetora das células

NK é resultado da integração de sinais inibitórios e ativadores provenientes das células alvo.

Sabe-se que a densidade das moléculas e MHC classe I é fundamental para a regulação da citotoxicidade das células NK, porém ainda são discutidos os mecanismos sinalizadores dessa modulação (306). Em condições homeostáticas, ambos os tipos de receptores ativadores e inibitórios exercem a transdução de sinais, sendo que os sinais inibitórios prevalecem e a função citotóxica das células NK é inibida (Figura 1.3). Na teoria “missing-self”, se os MHC de classe I estiverem com densidade diminuída e se receptores ativadores transmitirem sinal positivo, as células NK tornam-se citotóxicas em relação ao alvo (307, 308). Entretanto, a teoria “induced self” postula que mesmo não havendo alteração no MHC de classe I, um aumento de ligantes para os receptores ativadores (como uma infecção viral) pode se sobrepor à dominância dos receptores inibitórios e as células NK são ativadas (309).



**Figura 1.3: Teorias do reconhecimento de células alvo pelas células NK.**

A densidade das moléculas de MHC de classe I é importante para a inibição da resposta citotóxica (missing self), porém a alta expressão de ligantes para receptores ativadores, pode desencadear a citotoxicidade (“induced self”).

## **Receptores ativadores e inibitórios da resposta de células NK**

Observam-se diversas famílias de receptores, em que uma mesma família apresenta tanto receptores inibitórios quanto receptores ativadores. Os principais receptores descritos pertencem as famílias dos KIR (receptores semelhantes a imunoglobulina de células “Killer”), NGK2 e NCRs (receptores de citotoxicidade natural) (121).

Os receptores KIR são receptores bastante polimórficos que tem como ligantes os diversos alelos de MHC classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) humanos expressos nas células alvo. O receptores KIR possuem ectodomínios semelhantes à imunoglobulina e, em geral, os receptores podem ter 2 (KIR2D) ou 3 domínios (KIR3D). Ambas as formas podem transmitir sinais ativadores ou inibitórios às células NK, dependendo de sua cauda citoplasmática. KIRs inibitórios (KIR2DL ou KIR3DL) possuem uma longa cauda citoplasmática que contém dois domínios ITIM (motivo inibitório de receptores imunológicos baseados em tirosina), que inibem a atividade celular. (310) KIRs ativadores (KIR2DS ou KIR3DS) tem cauda citoplasmática menor que interage com a molécula adaptadora DAP12 que contém domínios ITAMs (motivo ativador de receptores imunológicos baseado em tirosina). Sabe-se que os KIRs inibitórios se ligam a vários alelos dos HLA tipo I humanos, porém até o momento pouco se conhece sobre os ligantes dos KIRs ativadores. Apesar de tanto os KIRs quanto os HLA serem altamente polimórficos, a ligação entre eles ocorre em motivos compartilhados entre os alelos de HLAs (311).

A família NKG2 é composta de receptores lectina do tipo C que formam heterodímeros com a molécula CD94. O complexo NKG2-CD94 reconhece moléculas de HLA-E na superfície de células alvo. Os receptores NKG2A e NKG2B são inibitórios e possuem domínios ITIM, enquanto NKG2C, NKG2E e NKG2H são ativadores e sinalizam via DAP12 (que contém motivo ITAM). Já a molécula NKG2D, apesar da nomenclatura, é bastante distinta do resto da família NKG2, embora também seja uma lectina do tipo C. Esse receptor é invariante e reconhece moléculas associadas à cadeia de MHC classe I e também moléculas induzidas pelo stress celular, como MICA/B e proteína ligadora de UL16. Outra singularidade em relação ao resto da família é a formação de homodímeros e a utilização da molécula adaptadora DAP10 (que contém motivo ITAM) para transmitir sinais ativadores provenientes de células alvo. (312)

Os receptores de citotoxicidade natural (NCRs) são expressos majoritariamente em células NK e até o momento consistem nos receptores ativadores NKp30, NKp44 e NKp46 (313). Esses receptores são membros da superfamília das imunoglobulinas, porém se assemelham estruturalmente aos KIRs e LILRs. NKp46 e NKp30 são expressos em células NK quiescentes ou em ativação, enquanto NKp44 é expresso em células NK ativadas por IL2. A densidade superficial dos NCRs correlaciona com a magnitude da atividade citolítica contra células alvo suscetíveis. A transdução de sinais ativadores utiliza os adaptadores DAP12, CD3 $\zeta$  e Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ , quando reconhece seus ligantes que são em sua maioria de origem viral (310).

Outras duas moléculas de superfície – CD16 e LFA1 – são de extrema importância para a atividade de células NK, principalmente com relação a citotoxicidade. A molécula CD16 é um receptor de imunoglobulina G de baixa afinidade (Fc $\gamma$ R1IIIA) e a sua expressão capacita as células NK, principalmente a subpopulação CD56<sup>dim</sup>, a serem citotóxicas mediante reconhecimento da porção Fc de IgG ligadas a superfícies celulares, eliminando então células tumorais ou infectadas. Apenas a ligação de CD16 com os anticorpos adsorvidos na superfície da célula alvo é suficiente para induzir a degranulação de células NK (314). Já a molécula LFA-1 é uma integrina expressa em todos os leucócitos, formando heterodímeros com CD11a e CD18. A LFA-1 se liga à ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e medeia a formação da sinapse imunológica. Em células NK, a LFA-1 possui sinalização diferente em relação às CTLs (linfócitos T citotóxicos), porque a ligação LFA-1:ICAM-1 é suficiente para induzir a polarização dos grânulos citolíticos das células NK na sinapse imunológica, enquanto em CTLs é necessário o sinal do TCR para que ocorra uma mudança conformacional na LFA-1, levando a transdução de sinal por essa molécula (314, 315).

## *Função efetora das células NK*

A integração dos sinais ativadores e inibitórios desencadeia a função efetora das células NK que é caracterizada pela produção de mediadores solúveis inflamatórios e, principalmente, pela citotoxicidade às células alvo. A liberação de grânulos citolíticos pelas células NK permite a apoptose de células alvo, mecanismo esse dependente da secreção de granzima/perforina ou expressão de TRAIL/FASL na superfície celular (316).

No sistema perforina/granzima, a perforina torna-se ativa devido à presença de altas concentrações de cálcio e pH neutro na fenda intercelular, e se oligomeriza fazendo poros heterogêneos na membrana da célula alvo. (317, 318). A perforina possui um peptídeo sinalizador e um domínio de complexo de ataque a membrana que tem atividade lítica na porção aminoterminal (319) e um domínio C2 capaz de se ligar a membranas de maneira cálcio dependente (320). Os poros de perforina permitem a difusão de granzimas pela membrana da célula alvo. Uma vez intracitoplasmática, as granzimas podem induzir a apoptose em via dependente ou independente das caspases. Na primeira, a ativação das caspases culmina com geração de reativos ativos do oxigênio, dano mitocondrial e fragmentação do DNA. As vias independentes de caspases ativam nucleases que vão induzir a fragmentação em DNA fita simples ou bloqueiam enzimas reparadoras de DNA (321).

As proteínas pró-apoptóticas FASL e TRAIL foram também colocalizada nos grânulos citolíticos (322, 323) e a degranulação permite a exposição de FasL e TRAIL na membrana das células NK (324, 325). A ligação de Fas e TRAIL-R nas células alvo com FasL e TRAIL nas células NK propicia a formação do complexo de sinalização de morte (DISC), ativação das caspases e indução da apoptose das células alvo. Foi demonstrado ainda que o TRAIL possa induzir a permeabilização das membranas lisossomais, resultando na liberação de cathepsina B que leva a ativação da via mitocondrial de apoptose (326), levando a morte das células alvo. Apesar de ambos serem fatores citotóxicos/apoptóticos em células NK (327, 328), são poucos os trabalhos que descrevem a importância de ambas as moléculas para a função efetora das células NK. FasL e TRAIL possuem sinalização intracelular bastante parecida, entretanto observa-se que células NK imaturas (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>

CD161<sup>+</sup>) parecem utilizar uma via dependente de TRAIL, mas não de FasL para induzir a apoptose em células alvo. Por outro lado, células NK maduras (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>) seriam capazes de utilizar ambos os mecanismos (224).

As células NK recebem sinais integradores de seus receptores ativadores e inibitórios que levam a produção de citocinas, como o IFN $\gamma$ . Entretanto, por serem linfócitos circulantes, as células NK também são influenciadas por citocinas solúveis, que podem promover funções efetoras, independente dos sinais dos receptores ativadores e inibitórios da citotoxicidade. De um modo geral, as citocinas regulam o desenvolvimento linfóide, a homeostase, a diferenciação, a tolerância e a memória no sistema imunológico. Em células NK, as citocinas regulam a sua ontogenia, a sobrevivência, a proliferação, a ativação/maturação e a citotoxicidade, sendo os mediadores solúveis IL2, IL15, IL12, IL18 e IFN tipo I os principais atores dessa regulação (329).

IL2 – Esta citocina é produzida por DCs maduras e células T ativadas e medeia sua atividade em células NK através dos receptores IL2R $\alpha\beta\gamma$  (alta afinidade) ou IL2R $\beta\gamma$  (afinidade intermediária). A IL2 influencia a proliferação e ativação das células NK em linfócitos Killer ativados (LAK) (330, 331). As células NK CD56<sup>bright</sup> apresentam alta expressão do IL2R $\alpha\beta\gamma$  (receptor de alta afinidade para a IL2), propiciando a rápida resposta proliferativa mesmo a pequenas concentrações de IL2 (302). Ainda, a IL2 promove a expressão de KIRs, CD16, NCRs e perforina na população CD56<sup>bright</sup> presente nos linfonodos (305), tornando-as citotóxicas.

IL15 – Um papel crítico na ontogenia das células NK foi atribuído a esta citocina (332, 333). A IL15 utiliza seu receptor IL15R $\alpha$  e subunidades do receptor de IL2 para mediar funções de proliferação (334) e sobrevivência (335). A IL15 induz citotoxicidade mediada por TRAIL em células NK (336). As células NK reconhecem o complexo IL15R-IL15 presente na membrana de APCs (como macrófagos e DCs), requerendo, portanto contato celular para sua função biológica (337, 338). Assim, hierarquicamente, as funções ativadoras da IL15 estão submetidas aos receptores inibitórios durante a SI.

IL18 – Atua diretamente ou em conjunto com outras citocinas na produção de IFN $\gamma$  pelas células NK. A IL18 também pode aumentar o potencial citotóxico das células NK (339, 340) e contribuir para o potencial migratório dessas células através

da expressão de CCR7 (341) e também pela produção de quimiocinas (CCL3 e CCL4) pelas células NK ativadas (342).

IL12 – Esta citocina é secretada por macrófagos, monócitos e células dendríticas e tem ação direta na polarização de resposta tipo 1 de células T. Durante a estimulação *in vitro* de células NK, observa-se que a IL12 sozinha é um estímulo fraco para a produção de citocinas, como IFN $\gamma$ . Por outro lado, esta citocina é um potente estímulo da citotoxicidade das células NKs contra diversas células tumorais (343, 344), uma vez que atua aumentando a expressão de receptores de ativação, sem afetar a expressão de receptores inibitórios (345).

IFN tipo I – Os interferons do tipo I (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ) influenciam fortemente as células NK (131, 346) principalmente durante as infecções virais, quando são altamente produzidos pelas células dendríticas plasmacitoides. A sinalização de IFN tipo I leva a expressão de CD69 (347), ao forte aumento da citotoxicidade (347, 348) e em menor escala, na produção de IFN $\gamma$  pelas células NKs (349). A citotoxicidade das células NK mediada pela expressão de TRAIL na membrana também pode ser induzida por IFNs do tipo I (350-352).

Desse modo, diversas combinações de estímulos podem levar a produção de citocinas e quimiocinas pelas células NK. No caso da produção da citocinas efetora IFN $\gamma$ , a combinação de citocinas ao invés da sua ação individual parece mais eficiente para a produção de IFN $\gamma$ . Esse sinergismo foi observado para combinações IL12+IL2 (353, 354), IL2+IL18 (340), IL12+IL18 (355, 356), IL12+IL15 (355), IL15+IL18 (357), IFN $\alpha$ +IL12 (356), IFN $\alpha$ +IL18 (356). De um modo geral, a citocina IL12 é um dos principais fatores para a produção de IFN $\gamma$  pelas células NK. Além disso, a ligação a alguns receptores de ativação pode induzir a liberação de IFN $\gamma$ , como 2B4+CD16+NKG2D. A produção de IFN $\gamma$  é muito mais rápida em células NK do que em células T, mas é resultado de uma complexa integração de sinais, cujos requisitos para liberação da citocina são maiores que os necessários para degranulação (358). Outras citocinas também são produzidas pelas células NK durante a ativação como TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL10 e IL13 (359), e quimiocinas como CCL3, CCL4, CCL5 e CCL8 e não necessitam de um sinal forte para serem liberadas (358). De maneira diferencial, as citocinas regulatórias IL10 e IL13 são produzidas por CD56<sup>bright</sup> e pela estimulação por outras citocinas (IL15), sugerindo um papel regulador por essa população.

São observadas diferenças na função efetora de subpopulações de células NK com relação à citotoxicidade e também a produção de citocinas. As células CD56<sup>bright</sup> são intensa produtoras de citocinas, como TNF $\alpha$ , GM-CSF e IL10, mas principalmente de IFN $\gamma$ , sugerindo a função imunorreguladora dessa subpopulação (302). As células NK também respondem rapidamente a citocinas presentes no meio. Por exemplo, essa subpopulação interage com células dendríticas nos tecidos linfoides produtoras de IFN tipo I, IL2, IL15 e IL18, que estimulam a produção de IFN $\gamma$  pelas células NK (360, 361). O IFN  $\gamma$  pode levar a ativação das APCs, com o aumento da expressão de MHC de classe I e a ativação de macrófagos contra parasitas intracelulares (362). A citotoxicidade dessa subpopulação é reduzida e uma das razões é a diminuída expressão de perforina e de receptores KIR. As células CD56<sup>bright</sup> que não expressam CD16, possuem capacidade citotóxica via ADCC quase nula. Porém, o tratamento com IL2 ou IL12 aumenta dramaticamente a citotoxicidade dessa subpopulação (363). Além disso, em linfonodos, células dendríticas imaturas podem ser eliminadas por células NK CD56<sup>bright</sup> NKG2A/CD94<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> (364), em um mecanismo NKp30-dependente (365). Recentemente, observou-se que essa população de células NK pode eliminar células T CD4 autólogas em um mecanismo dependente de TRAIL, NKG2D e LFA-1, comprovando que as CD56<sup>bright</sup> podem ser citotóxicas, mas provavelmente por mecanismos diferentes que a subpopulação CD56<sup>dim</sup> (366).

As células CD56<sup>dim</sup> expressam diversas moléculas inibidoras e ativadoras da citotoxicidade, como por exemplo o CD16, KIRs e CD94/NKG2A, que permitem reconhecimento de células potencialmente infectadas/transformadas, demonstrando maior potencial de citotoxicidade via perforina/granzima. Assim como as CD56<sup>bright</sup>, as CD56<sup>dim</sup> são capazes de produzir intensas quantidades de citocinas, porém de maneira dependente do reconhecimento de células alvo (367). A teoria de que essa subpopulação seria um estado de desenvolvimento mais maduro das células NK é cada vez mais aceita. De fato, esse subtipo celular tem uma reduzida capacidade proliferativa, em razão da expressão dos receptores de IL2 de baixa afinidade (IL2R $\beta\gamma$ ), ao contrário da forma mais imatura CD56<sup>bright</sup> (368).

A função efetora de células NK pode ser diretamente influenciada pelos fagócitos do sistema imunológico inato. Enquanto as células NK afetam a maturação de DCs ou a ativação de macrófagos pela produção de IFN- $\gamma$  (369-371), os fagócitos estimulam as células NK a produzirem IFN $\gamma$ , através da produção de IFN $\alpha$ , IL12,

IL15 e IL18; ou através do contato celular, via NKp30 ou CX3CL1 no caso das DCs (365, 372) ou 2B4 no caso dos monócitos (373). O contato entre DCs e células NK culmina no aumento da expressão de CD69 (molécula de ativação precoce) em células NK (374-376), a proliferação da população (377, 378) e a citotoxicidade das células NK (375, 379). A ligação de KIRs e NKG2A/CD94 protege as DCs maduras da apoptose induzida pelas células NK (370), enquanto as DCs imaturas são eliminadas via NKp30. As células NK seriam capazes de eliminar macrófagos ativados (373).

### *As células NK na imunidade antiviral*

A contribuição das células NK para a imunidade antiviral foi demonstrada primordialmente em modelos murinos. Em seres humanos, são raras porém variadas as deficiências relacionadas a falta de funcionalidade de células NK. Nessas síndromes de imunodeficiência observa-se o bloqueio completo ou parcial da função e alteração nos números das NK. Nessas condições, os pacientes apresentam diversas síndromes virais durante a adolescência causadas pelo vírus varicela zoster (VZV), citomegalovírus (CMV), papiloma vírus (HPV) e principalmente pelo vírus da herpes (HSV), demonstrando o papel fundamental das células NK em controlar infecções virais. (380)

Nesse contexto, diversos mecanismos que resultam na inibição das funções efetoras das células NK durante as infecções virais são descritos (381). A inibição da detecção de células infectadas pelos receptores inibitórios e ativadores das células NK caracterizaria um escape viral. Por exemplo, a proteína nef codificada pelo HIV-1 é capaz de diminuir a expressão de HLA-A e B, mantendo a expressão de HLA-E, evitando assim o reconhecimento pelos linfócitos T citotóxicos e pelas células NK, respectivamente (382). Mutações na hemaglutinina do vírus da Influenza foram correlacionadas com a diminuição da apoptose das células infectadas induzida pelas células NK, sugerindo um escape do reconhecimento dos NCRs (383). Outras investigações relatam o escape do reconhecimento via NKG2D, através da interferência na expressão de seus ligantes que são proteínas indicadoras do estresse celular. A proteína nef do HIV-1 diminui a expressão de superfície de MICA, ULBP-1 e ULBP-2 (384), assim como as proteínas UL16 e UL142 do citomegalovírus humano (HCMV). Ainda, um RNA de interferência é codificado pelo

HCMV e previne a tradução de MICB (385). Também foi mostrada uma inibição da sinalização, em células NK, de LFA-1 pela proteína tat do HIV-1, culminando na diminuída degranulação (386).

A produção de citocinas e quimiocinas pode ser modulada por diversos vírus, impactando nas funções de células NK. Por exemplo, membros da família dos Herpesviridae e Capripoxviridae codificam receptores de quimiocinas nas células infectadas, desviando a resposta imunológica (387). O vírus Epstein-Barr (EBV) codifica uma IL10 que inibe a produção de citocinas em células NK (388). Uma proteína ligadora de IL18, fundamental na produção de IFN $\gamma$  pelas células NK, é codificada por um poxvírus (389).

As vias apoptóticas, principal mecanismo de citotoxicidade das células NK, são frequente alvo de escape viral. Diversos herpesvírus codificam uma proteína (v-FLIP) que interfere com a sinalização de TRAIL-R e FAS nas células alvo, bloqueando a interação do domínio de morte nesses receptores com as caspases apoptóticas (390). Recentemente, observou-se que a proteína UL141 do HCMV pode bloquear a transdução do sinal dos receptores de TRAIL, potencialmente interferindo nesse mecanismo de citotoxicidade (391).

As funções efetoras das células NK podem estar associadas com a imunopatogenia ou com uma imunidade protetora durante o estabelecimento de infecções virais. Diversos aspectos funcionais das células NK foram correlacionados com o prognóstico de doenças virais, como os polimorfismos nos receptores KIR, a frequência das subpopulações de células NK nos diferentes compartimentos, as diferenças na expressão de receptores NCRs e da família de NKG2, a produção de citocinas e a expressão de marcadores de citotoxicidade nessas células (381, 392).

Os polimorfismos nos receptores KIR codificam mudanças nessas proteínas que interferem na sua ligação com o complexo antígeno-MHC de classe I, modulando o sinal inibitório/ativador para as células NK. Por exemplo, vírus podem apresentar certos antígenos com afinidade aumentada para determinados alelos de MHC classe I, tornando mais forte a sua ligação a um KIR inibitório e escapando da citotoxicidade das células NK (393). Ainda, considerando que cada KIR reconhece um conjunto específico de alelos de HLA, a expressão de pares KIR:HLA pode estar correlacionada com o prognóstico da infecção. De fato, a expressão de KIR3DS1 ou KIR3DL1 e HLABw4-80I foi associada a menor progressão para AIDS (394, 395) ou

ao controle da carga viral do HIV (396). A expressão de KIR2DL3:HLAC1 e KIR3DS1:HLABw4-80I foi correlacionada a resolução ou a proteção contra gravidade em pacientes com HCV (397, 398). Por outro lado, os pares KIR2DL2/3:HLAC1 e KIR3DL1/S1:HLABw6 foram relacionados com a progressão para gravidade em pacientes com Influenza (399, 400). Assim, o requerimento de pares KIR:HLA e a poligenia e polimorfismo desses receptores, pode permitir tanto o aumento da replicação viral quanto o estabelecimento da resposta imunológica efetiva.

As subpopulações de células NK podem estar alteradas, tanto nos seus números quanto nas frequência durante uma infecção viral. Investigações mostram que, no sangue, os números de células NK totais estão diminuídos e que a subpopulação CD56<sup>bright</sup> está expandida em pacientes com HCV crônico (401, 402). A vacinação contra febre amarela exhibe também uma expansão de CD56<sup>bright</sup> e diminuição de CD56<sup>dim</sup> havendo correlação a vacinação à uma ativação moderada de resposta imunológica (403). Por outro lado, durante a fase aguda do HIV-1, os números de células NK totais se mostram aumentados no sangue (106, 404). Além disso, a expansão de uma subpopulação rara CD56<sup>-</sup> de células NK é relatada para HCV (405) e HIV-1 (404). Durante a resposta antiviral, as células NK podem proliferar e migrar para os tecidos ou morrer por apoptose. Ainda, os níveis de citocinas circulantes ou os receptores ativadores podem ser determinantes para a expansão e migração das células NK para os diversos compartimentos do organismo (406).

A expressão dos receptores ativadores pode ser correlacionada com o prognóstico de doença. A resolução de HCV foi relacionada a menor expressão de CD161, NKG2D, NKG2A/C/E, NKp30 e NKp46 em células de pacientes de fase aguda comparando aos que evoluíram para os quadros crônicos (401, 405). Ainda, células NK CD94/NKG2A<sup>+</sup> se encontram aumentadas em quadros crônicos de HCV (407). A expressão aumentada de 2B4 e diminuída de NKp46 em células NK é correlacionada a vacinação com influenza (408). Assim, subpopulações de células NK expressando especificamente um conjunto de receptores de ativação podem ser fundamentais para uma resposta eficaz frente a um patógeno.

Com relação aos aspectos funcionais das células NK, a citotoxicidade reduzida pode permitir um escape viral, porém se exacerbada contribuiria para a

patologia observada, por exemplo, em órgãos como fígado e pulmão. De fato, em análises de fígado pós-mortem de pacientes com febre amarela, foi encontrado um grande infiltrado de células NK e uma intensa apoptose de hepatócitos (409). A intensa produção de IFN $\gamma$  por células NK também foi associada a casos de reação adversa a vacinação para febre amarela (410). Ainda, em casos de reativação de HBV, as células NK expressando TRAIL contribuíram para a inflamação do fígado e morte dos hepatócitos (352). Por outro lado, em pacientes com hepatite por HCV, uma forte resposta citotóxica, caracterizada pela expressão de TRAIL e do marcador de degranulação CD107a nas células NK periféricas, foi encontrada em indivíduos que entraram em contato com HCV, mas foram curados (411). Pacientes com HCV crônico exibiram reduzida citotoxicidade (baixa expressão de TRAIL e CD107a) que foi recuperada *in vitro* pela adição de IFN $\alpha$  (412). De fato, no caso do HCV, a resposta citotóxica parece ser protetora. O tratamento com IFN $\alpha$  foi capaz de aumentar a expressão de TRAIL nas células NK e foi encontrada uma correlação negativa com a carga viral nesses pacientes (351).

## **As células NK durante a imunopatologia da dengue**

Muitas questões sobre o papel das células NK durante a infecção pelo DENV necessitam ser respondidas. Observou-se que os flavivírus, como vírus da febre do Nilo (WNV), vírus da febre amarela (YFV), vírus Dengue (DENV) e vírus da encefalite japonesa (JEV) têm uma capacidade em aumentar a expressão de MHC de classe I, o que acarretaria diminuída citotoxicidade de células NK em linhagens celulares infectadas (127, 413, 414). Entretanto, essas células exercem a citotoxicidade em modelos de cultura *in vitro* (415), sugerindo que as funções efetoras estejam ativadas durante o estabelecimento da infecção.

De fato, o papel da citotoxicidade das células NK na dengue pode ser protetor. As células NK CD69<sup>+</sup> circulantes foram associadas a casos brandos da doença (106). Recentes análises genômicas revelaram que aspectos funcionais das células NK estariam diminuídos em pacientes com a síndrome do choque do Dengue (416) e que o gene do receptor ativador 2B4 é expresso diferencialmente em pacientes brandos (417). Entretanto, não se sabe ainda se as células NK apresentariam evidências de citotoxicidade durante as infecções naturais, como a expressão de indicadores de degranulação ou de outros aspectos funcionais, como a expressão de TRAIL, nem qual seria a relação desses mediadores para a imunopatologia da dengue. Pode-se levantar a hipótese que os mecanismos efetores citotóxicos das células NK estejam contribuindo para a rápida eliminação da carga viral, e conseqüentemente, para o reestabelecimento da homeostasia.

## 2 Objetivos

---

Estudar as características antivirais e citotóxicas de células dendríticas plasmacitoides (PDCs) e de células *Natural Killer* (NK), e de mediadores solúveis relacionados a estas células, em pacientes com a febre da dengue durante a fase aguda e em modelos *in vitro* de interação com o vírus Dengue-2.

### 2.1 Objetivos específicos

Estudar o estado de ativação de células dendríticas plasmacitoides circulantes em pacientes com febre do dengue em fase aguda, detectando a externalização do TRAIL para a superfície celular, assim como fatores antivirais/citotóxicos relacionados à funcionalidade das PDCs no plasma (IFN $\alpha$ , TRAIL solúvel).

Determinar a capacidade do vírus Dengue 2 em ativar PDCs humanas *in vitro* durante estimulação de PBMCs ou PDCs purificadas de doadores saudáveis, observando a expressão de TRAIL, produção de fator antiviral IFN $\alpha$  e estudando possíveis vias de ativação/ infecção das PDCs pelo vírus.

Estudar a interferência de PDCs na replicação viral durante cocultura com monócitos humanos autólogos infectados com DENV-2, observando possíveis papéis dos fatores IFN $\alpha$  e TRAIL.

Caracterizar o estado de ativação de células NK circulantes em pacientes com febre do dengue em fase aguda, detectando a frequência e a expressão de moléculas antivirais/citotóxicas (TRAIL e CD107a).

Determinar a capacidade do vírus Dengue 2 em ativar células NK humanas durante a estimulação em cultura de PBMCs de doadores saudáveis e sua possível relação com a ativação de PDCs e produção de IFN $\alpha$ .

## 3 Metodologia

---

### 3.1 Considerações éticas de amostras humanas

No Brasil, os procedimentos experimentais com células humanas de pacientes foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, FIOCRUZ (CAAE 3723.0.000.009-08). Todos os pacientes envolvidos nesse estudo foram informados dos procedimentos e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (cópia no Anexo 3). Os doadores saudáveis foram obtidos anonimamente do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF). O laboratório de Imunologia Viral possui autorização para manipulação de células de doadores saudáveis dada pelo comitê de ética da FIOCRUZ sob o número 111/000. Na França, os doadores saudáveis foram obtidos anonimamente do banco de sangue do “Etablissement Français du Sang” (EFS) sobre a convenção #07/CABANEL/106.

### 3.2 Amostras de pacientes e de doadores saudáveis

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) utilizadas para os experimentos *in vitro* ou como controles para pacientes foram obtidos de bolsas de fase leucocitária dos bancos de sangue do HUCFF-RJ/Brasil ou do EFS-Paris/França de doadores com sorologia negativa para Sífilis, Doença de Chagas, Hepatites, HIV-1 e 2 e HTLV-1 e 2. O sangue venoso de pacientes com suspeita de dengue (n total = 51) foi colhido durante a epidemia de 2010 nos centros de saúde do Hospital Dia em Campo Grande, Mato Grosso do Sul e no Centro de Referência em Dengue, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

### 3.3 Critérios para classificação de dengue e diagnóstico laboratorial

A classificação dos pacientes desse estudo foi realizada de acordo com os critérios da OMS de 2009 (6). Febre do dengue com sinais de alarme (FDCA) foi considerada quando os pacientes apresentaram quaisquer dos sinais de alerta seguintes: 1) dor ou fragilidade abdominal; 2) vômitos persistentes; 3) acúmulo clínico de fluidos; 4) sangramento de mucosas; 5) letargia; 6) aumento de mais de 2 cm no fígado; associado com parâmetros laboratoriais como aumento do

hematócrito com concomitante queda brusca no número de plaquetas (abaixo de 50.000/mm<sup>3</sup>). A Dengue Grave foi considerada se o paciente apresentou febre de 2 a 7 dias mais quaisquer um dos sinais seguintes: 1) evidências de extravasamento plasmático, como aumento progressivo no hematócrito (hemoconcentração); efusão pleural ou ascite; comprometimento circulatório ou choque (taquicardia, extremidades frias e pegajosas, reenchimento capilar maior que três segundos, pulso indetectável ou fraco, pressão no pulso estreita ou não aferível); 2) sangramentos internos significantes. A infecção pelo DENV foi confirmada laboratorialmente através de ELISA dengue-IgM específico, RT-PCR sorotipo específica ou por isolamento viral (418). O sorotipo detectado nas amostras de soro dos pacientes foi predominantemente DENV-2, sendo detectado em 7 pacientes com FDSA, 5 pacientes com FDCA e 4 com Dengue Grave. O DENV-1 também foi detectado em 6 pacientes não graves. Toda a confirmação laboratorial dos casos de Dengue foi realizada pelo Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz – RJ, sob a direção da Dra. Rita Nogueira.

### 3.4 Material e reagentes

#### 3.4.1 Meios de cultura e suplementos

| Produto                        | Código Fabricante | Fabricante             |
|--------------------------------|-------------------|------------------------|
| Meio RPMI 1640                 | 11875             | Gibco/Lifetechnologies |
| Meio DMEM, baixa glicose       | 11885             | Gibco/Lifetechnologies |
| Tampão HBSS                    | 14170             | Gibco/Lifetechnologies |
| Tampão DPBS 10x                | 14200             | Gibco/Lifetechnologies |
| Penicilina-estreptomicina 100x | 15140             | Gibco/Lifetechnologies |
| L-glutamina 100x               | 25030             | Gibco/Lifetechnologies |
| HEPES 2M                       | 15360             | Gibco/Lifetechnologies |
| Soro Fetal Bovino              | 12657             | Gibco/Lifetechnologies |
| Aminoácidos não essenciais     | 11140             | Gibco/Lifetechnologies |
| Triptose Fosfato               | T8782             | Sigma-Aldrich          |
| Albumina bovina                | A8022             | Sigma-Aldrich          |

#### 3.4.2 Reagentes

| Produto                            | Código Fabricante | Fabricante                  |
|------------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Ficoll-Hypaque                     | 17-1440-2         | GE healthcare Life Sciences |
| Lymphoprep                         | 07851             | STEMCELL                    |
| EasySep™ Human Monocyte Enrichment | 19058             | STEMCELL                    |

|   |            |                                    |
|---|------------|------------------------------------|
| <b>Kit without CD16 Depletion</b>   |            |                                    |
| <b>EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit</b>                                 | 18058      | STEMCELL                           |
| <b>EasySep™ Human Plasmacytoid DC Enrichment kit</b>                              | 19062      | STEMCELL                           |
| <b>Saponina</b>   | S7900      | Sigma-Aldrich                      |
| <b>Tampão EDTA</b>  | AM9261     | Ambion                             |
| <b>Paraformaldeído</b>  | P6148      | Sigma-Aldrich                      |
| <b>Acetona P.A.</b>   | 002        | Vetec                              |
| <b>DMSO</b>   | D4540      | Sigma-Aldrich                      |
| <b>TMB</b>  | T0440      | Sigma-Aldrich                      |
| <b>Cloroquina (sal difosfato)</b>   | C6628      | Sigma-Aldrich                      |
| <b>CpG-A ODN 2216</b>   | tIrl-2216  | Invivogen                          |
| <b>Fluoromount</b>  | F4680      | Sigma-Aldrich                      |
| <b>DAPI</b>   | D9542      | Sigma-Aldrich                      |
| <b>ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI</b>                                   | P10144     | Molecular Probes/Life Technologies |
| <b>Anexina V-PE</b>   | 556422     | BD Pharmingen                      |
| <b>TOPRO-3</b>  | T3605      | Molecular Probes/Life Technologies |
| <b>Binding Buffer 10x</b>   | 556454     | BD Pharmingen                      |
| <b>StemSep™ Anti-Human CD32 Blocker</b>   | 14551      | STEMCELL                           |
| <b>Zenon® Alexa Fluor® 647 Mouse IgG2a Labeling Kit</b>                           | Z25108     | Molecular Probes/Life Technologies |
| <b>Alexa Fluor® 647 Antibody Labeling Kit</b>                                     | A20186     | Molecular Probes/Life Technologies |
| <b>Alexa Fluor® 488 Antibody Labeling Kit</b>                                     | A20181     | Molecular Probes/Life Technologies |
| <b>Human Interferon alpha/beta receptor chain (MMHAR-2) neutralizing antibody</b> | 21385-1    | PBL interferon source              |
| <b>Human Interferon alpha (2a)</b>  | 11100-1    | PBL interferon source              |
| <b>Recombinant Human TRAIL-R2 Fc Chimera</b>                                      | 721-DR-100 | R&D Systems                        |
| <b>Recombinant Human TRAIL</b>  | 375-TL-101 | R&D Systems                        |
| <b>Human TRAIL antibody (neutralizante)</b>                                       | MAB375     | R&D Systems                        |
| <b>Human TRAIL/TNFSF10 Quantikine ELISA Kit</b>                                   | DTRL00     | R&D Systems                        |
| <b>VeriKine™ Human Interferon Alpha ELISA Kit</b>                                 | 41100-1    | PBL interferon source              |
| <b>Human IL-12 (p40) ELISA Set</b>  | 555171     | BD Biosystems                      |
| <b>Human IL-15 duoset</b>   | DY247      | R&D Systems                        |

### 3.4.3 Anticorpos

| Fluorocromo            | Anticorpo contra           | Origem | Clone       | Concentração | Código      | Fabricante                         |
|------------------------|----------------------------|--------|-------------|--------------|-------------|------------------------------------|
| <b>Purificado</b>      | Antígenos do complexo DENV | Camun. | D3-2H2-9-21 | 4 a 10 µg/mL | MAB8705     | Millipore                          |
| <b>Purificado</b>      | TRAIL (CD253)              | Camun. | RIK-2       | 3 µL/teste   | 12-9927-41  | Affimetryx/eBio sciences           |
| <b>Cy®3</b>            | IgG murino                 | Burro  | -           | 6 µg/mL      | 715-165-150 | Jackson ImmunoResearch             |
| <b>AlexaFluor® 488</b> | IgG murino                 | Cabra  | -           | 5 µg/mL      | A11001      | Molecular Probes/Life Technologies |
| <b>AlexaFluor® 647</b> | IgG murino                 | Cabra  | -           | 5 µg/mL      | A21235      | Molecular Probes/Life Technologies |
| <b>FITC</b>            | CD123 humano               | Camun. | AC145       | 1-5 µg/mL    | 130-090-897 | Miltenyi                           |

|                                 |                |        |          |              |                   |                                  |
|---------------------------------|----------------|--------|----------|--------------|-------------------|----------------------------------|
| FITC                            | CD16 humano    | Camun. | GRM1     | 1 µL/teste   | 9570-02           | Southern Biotech                 |
| FITC                            | HLADR,DP,DQ    | Camun. | CR3/43   | 2 µL/teste   | F0817             | DakoCytomation                   |
| FITC                            | BDCA-2 (CD303) | Camun. | AC144    | 1-5 µg/mL    | 130-090-510       | Miltenyi                         |
| Cy <sup>®</sup> 3               | Flavivírus     | Camun. | 4G2      | 1 µL/teste   | -                 | Cedido pelo Dr. Philippe Despres |
| PE                              | TRAIL (CD253)  | Camun. | RIK-2    | 4 a 8 µg/mL  | 550516            | BD Bioscience                    |
| PE                              | TLR3 (CD 283)  | Camun. |          |              |                   | ??                               |
| PE                              | CD4            | Camun. | RFT-4g   | 1 µL/teste   | 9522-09           | Southern Biotech                 |
| PerCP                           | CD14           | Camun. | TÜK4     | 1-5 µg/mL    | 130-094-969       | Miltenyi                         |
| PerCP                           | HLADR          | Camun. | L203     | 1 µL/teste   | FAB4869C          | R&D Systems                      |
| PerCP.Cy <sup>®</sup> 5.5       | CCR7           | Camun. | G043H7   | 1 µL/teste   | 353219            | Biolegend                        |
| PerCP.Cy <sup>®</sup> 5.5       | CD56           | Camun. | HCD56    | 2,5 µL/teste | 318321            | Biolegend                        |
| PE.Cy <sup>®</sup> 5.5          | CD56           | Camun. | CMSSB    | 1 µL/teste   | 35-0567-42        | eBiosciences                     |
| PE.Cy <sup>®</sup> 7            | CD11c          | Camun. | B-ly6    | 0,5 µL/teste | 561356            | BD pharmingen                    |
| APC                             | CD14           | Camun. | 61D3     | 1 µL/teste   | 17-0149           | eBiosciencie                     |
| APC                             | BDCA4 (CD304)  | Camun. | AD5-7F6  | 1-5 µg/mL    | 130-090-900       | Miltenyi                         |
| APC                             | CD3            | Camun. | HIT3a    | 0,5 µL/teste | 300312            | Biolegend                        |
| ATTO <sup>®</sup> 647           | TRAIL-R2       | Camun. | HS201    | 1 µL/teste   | AG-20B-0023TST100 | Adipogen                         |
| eFluor <sup>®</sup> 660         | LAMP1 (CD107a) | Camun. | eBioH4A3 | 5 µL/teste   | 50-1079           | eBioscience                      |
| APC.Cy7                         | CD4            | Camun. | OKT4     | 1 µL/teste   | 317418            | Biolegend                        |
| APC.AlexaFluor <sup>®</sup> 750 | CD4            | Camun. | RPA-T4   | 5 µg/mL      | 27-0049-73        | eBioscience                      |
| APC.eFluor <sup>®</sup> 780     | CD16           | Camun. | eBioCB16 | 5 µg/mL      | 47-0168-42        | eBioscience                      |
| Pacific Blue <sup>®</sup>       | CD3            | Camun. | HIT3a    | 0,5 µL/teste | 300312            | Biolegend                        |
| Pacific Blue <sup>®</sup>       | CD14           | Camun. | M5E2     | 4 µg/mL      | 558121            | BD Pharmingen                    |
| VioBlue <sup>®</sup>            | CD4            | Camun. | M-T466   | 1-5 µg/mL    | 130-097-333       | Miltenyi                         |
| V500 <sup>®</sup>               | CD3            | Camun. | 561416   | 5 µg/mL      | UCHT1             | BD Pharmingen                    |
| V500 <sup>®</sup>               | CD4            | Camun. | 560768   | 5 µg/mL      | RPA-T4            | BD Pharmingen                    |

### 3.4.4 Soluções

| Nome             | Formulação   |
|------------------|--|
| PBS 1x           | DPBS 10x em água deionizada q.s.p. pH 7,2                                  |
| PBS-BSA          | Albumina bovina 1% (p/v) em PBS 1x q.s.p.                                  |
| PBS-SFB          | Soro fetal bovino 2% (v/v) em PBS 1x q.s.p.                                |
| HBSS-SFB-EDTA    | Soro fetal bovino 2% (v/v) e EDTA 1mM em HBSS q.s.p.                       |
| PFA              | Paraformaldeído 2% ou 4% (p/v) em PBS 1x q.s.p.                            |
| PBS-SAP          | Saponina 0,1% ou 0,15% (p/v) em PBS 1x q.s.p.                              |
| PBS-BSA-EDTA-SAP | Albumina bovina 1% (p/v), Saponina 0,15% (p/v) e EDTA 1mM em PBS 1x q.s.p. |

## 3.5 Cepa e massa viral

### 3.5.1 Manutenção da Linhagem celular

A massa viral foi crescida em linhagem de células de glândula salivar de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC CRL-1660). As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> com 30 mL de DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 0,5% de aminoácidos não essenciais e 10% de triptose fosfato. As garrafas foram mantidas a 28°C. As passagens foram realizadas duas vezes por semana através da remoção mecânica (agitação das garrafas) das células e divisão em 3 novas garrafas.

### 3.5.2 Cepa viral

Nos ensaios *in vitro* foi utilizada a cepa padrão de genótipo asiático cedida pelo Dr. Halstead (419), DENV-2 cepa Tailândia 16681 1984. Essa cepa padrão é usada no laboratório e sua infecção em modelos de monócitos humanos já foi bem estabelecida (37, 81).

### 3.5.3 Crescimento da massa viral

As culturas de células C6/36 foram adsorvidas por 90 min com 1,5 mL de inóculo viral de DENV-2 16681 de passagem #6 em C6/36. Após o tempo de adsorção, a cultura foi mantida com 30 mL de DMEM suplementado com 2% de SFB e mantido em estufa 28°C por 8 dias, quando o efeito citopático foi detectado (presença de sincício celular). Em seguida, o sobrenadante das culturas infectadas foi recolhido e *debris* celulares removidos por centrifugação de 10 min a 4°C em 1000g. Foram feitas alíquotas da massa viral adicionando-se 10% de SFB e as armazenando a -70°C. Células C6/36 não infectadas pelo DENV foram mantidas nas mesmas condições das células infectadas, em que seu sobrenadante foi recolhido para ser ministrado como controle, dos possíveis produtos secretados pela C6/36. Assim, este sobrenadante utilizado nos experimentos foi denominado Mock.

### 3.5.4 Ultracentrifugação da massa viral

Parte da massa viral, crescida como descrito no item 3.5.3, foi ultracentrifugada. Um “pool” dos sobrenadantes de MOCK ou DENV-2 foi feito em garrafas de cultura celular para homogeneizar a quantidade de proteínas obtidas em cada garrafa infectada ou não. Os volumes foram igualmente distribuídos em tubos

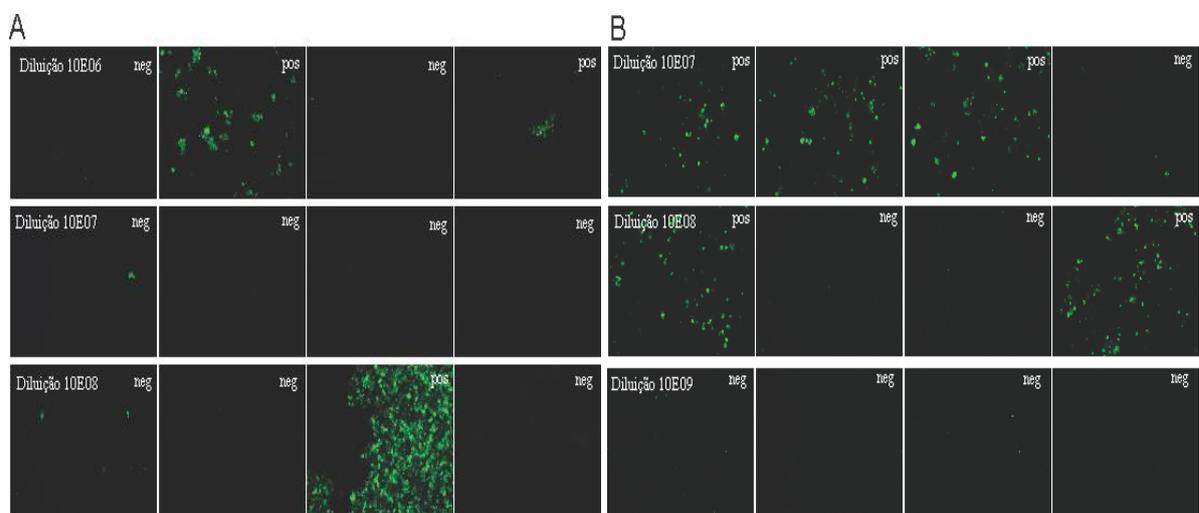
especiais para ultracentrifugação (volume final 70 mL) e tarados precisamente. Os sobrenadantes foram mantidos à temperatura ambiente durante todo processamento antes da ultracentrifugação. Foi utilizado o rotor fixo 50 Ti da ultracentrífuga Beckman e a seguinte configuração: 30.000 RPM (100.000g), aceleração média, sem freio, 75 min (já somando o tempo de desaceleração). Após a centrifugação, os tubos foram cuidadosamente retirados do rotor e desprezado o sobrenadante pela parede contrária, deixando cerca de 1mL em cima do “pellet” para sua hidratação. Após a homogeneização de todos os tubos com 1 mL de meio RPMI puro, foi feito um “pool” de líquido que foi filtrado em membrana 0,22 µm (bloqueada com RPMI 10% SFB). O volume final da suspensão viral foi corrigido com RPMI de modo que a suspensão final tenha SFB 10% e 20 vezes menos o volume inicial do sobrenadante de cultura infectado utilizado. O estoque viral ou MOCK ultracentrifugado foram armazenados a -70°C.

### 3.5.5 Titulação viral

A titulação viral foi realizada através de imunofluorescência indireta e calculada de acordo com Reed & Muench (420). Em placas de 96 poços fundo chato, foi adicionado 0,2 mL contendo  $5 \times 10^5$  células C6/36 /mL em DMEM com SFB 5%. A placa foi incubada em estufa a 28°C até o fechamento da monocamada (1-2 dias). Diferentes diluições do estoque original (diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-11}$ ) foram preparadas por diluição seriada do inóculo inicial. O sobrenadante da cultura em placa foi retirado e os diferentes inóculos virais de 0,1 mL foram adsorvidos (em quadruplicata) por 120 min/28°C. Após a incubação, o meio de todos os poços foi substituído com DMEM com SFB 5% e a placa foi incubada por 8 dias a 28°C. Após esse período, a cultura celular foi transferida para lâminas de imunofluorescência através de remoção mecânica com ponteira plástica.

A suspensão celular (0,025 mL), colocada em lâminas de imunofluorescência previamente lavadas, foi secada em temperatura ambiente. As lâminas foram rinsadas com PBS e imediatamente fixadas em acetona P.A. gelada por 20min/4°C. A cada orifício da lâmina foi adicionado 0,02 mL do anticorpo anti-DENV a 10 µg/mL em PBS-BSA e incubado em câmara úmida por 60 min/37°C. Após duas lavagens em PBS 10 min em temperatura ambiente (TA), foi adicionado 0,02 mL do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo AlexaFluor® 488 a 5 µg/mL em PBS-BSA e incubado em câmara úmida por 30 min/37°C. As lâminas foram lavadas duas vezes em PBS por 10 min/TA e rinsadas com água destilada para remoção de excesso de

sais. As lâminas foram montadas com Prolong<sup>®</sup> antifade contendo DAPI e observadas no microscópio óptico de fluorescência Evos<sup>®</sup> usando os cubos GFP para leitura do AlexaFluor 488 e DAPI para leitura do mesmo. O cálculo do título viral foi feito pela fórmula de Reed & Muench, o título foi obtido em TCID<sub>50</sub> /mL (do inglês *50% tissue culture infective dose*). Abaixo segue um experimento representativo do cálculo do título do vírus não ultracentrifugado em relação ao seu não ultracentrifugado. O título do primeiro foi de  $6,4 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL e o do ultracentrifugado foi de  $3,0 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL. As fotos abaixo ([Figura 3.1](#)) exibem as fotos de imunofluorescência nas diluições onde são detectados os últimos poços positivos da titulação viral.



**Figura 3.1: Imunofluorescência da titulação viral.**

Células C6/36 foram incubadas com diferentes diluições da massa viral de sobrenadante de cultura (**A**) ou ultracentrifugada (**B**) e incubadas por 8 dias. As células foram transferidas para lâminas de imunofluorescência e marcadas com anticorpo anti-DENV e anti-camundongo AlexaFluor<sup>®</sup> 488 e lidas no microscópio Evos. As imagens demonstram a detecção de antígenos viral (cor verde) em grupos celulares, e atribuição de “positivo” (pos) à diluição viral em questão. Na ausência de formações celulares com fluorescência verde foi atribuída a negatividade da infecção viral na referida diluição (neg).

## 3.6 Isolamento de células humanas

### 3.6.1 Isolamento de leucócitos humanos do sangue periférico

As células do sangue de pacientes com dengue foram obtidas através da coleta de tubos com heparina. O plasma foi separado da fase celular através de centrifugação a 1000g por 10min. A fase celular foi diluída em igual volume de meio RPMI e 8 mL do sangue diluído foi colocada em tubos Falcon de 15 mL por cima de uma camada de 5mL de Ficoll-Hypaque. Os tubos foram centrifugados a 400g por 30 min à TA em centrífuga sem freio. O anel de células mononucleadas foi

recuperado com auxílio de pipeta e lavado com 10 mL de meio RPMI por 2 vezes a 400g por 10min. As células foram ressuspensas em SFB e congeladas com volume final de DMSO 10%, primeiramente a -1°C/min até -70°C e armazenadas em nitrogênio líquido.

As células do sangue de doadores humanos, obtidas a partir de bolsas de fase leucocitária “Buffy Coat”, foram obtidas através da separação por gradiente de densidade. O volume de sangue obtido foi diluído em igual volume de PBS e cada 25-30 mL de sangue diluído foi colocado sobre 15 mL de Ficoll-Hypaque (ou Lymphoprep). Os tubos foram centrifugados a 400g (ou 800g) por 30 min a TA em centrífuga sem freio. O anel de células mononucleadas foi recuperado e lavado 2 vezes com PBS-SFB a 10°C por 10min, primeiramente a 300g e em seguida a 200g para remoção de plaquetas. A suspensão final foi ressuspensa em HBSS suplementado com 1mM de EDTA e 2% de SFB e contada em hemocítmetro (câmara de Neubauer) ou contador automatizado de partículas (Coulter®). A suspensão celular de PBMCs foi avolumada para  $50 \times 10^7$  células/mL em HBSS-SFB-EDTA.

### **3.6.2 Isolamento de monócitos de PBMCs**

O isolamento dos monócitos foi realizado utilizando kits comerciais de separação magnética positiva ou negativa da marca STEMCELL (ver seção 3.11.2). A utilização dos dois tipos de seleção não impactou em diferenças qualitativas dos resultados obtidos, porém a seleção negativa não exclui a presença de monócitos CD16<sup>+</sup>. As PBMCs foram transferidas para tubos cônicos de 5 mL de fundo redondo e 0,1mL (seleção positiva) ou 0,05mL (seleção negativa) por volume de suspensão celular total, do coquetel de anticorpos dos kits e incubadas por 15min/TA ou 10min/4°C, respectivamente. O Kit de seleção positiva contém anticorpos contra o antígeno CD14 humano feito em camundongos e ligados a um complexo tetramérico de anticorpos biespecífico. Esses anticorpos se ligam ao dextran que recobre as nanopartículas. No caso do kit de seleção negativa, o coquetel é composto de anticorpos contra os antígenos humanos: CD2, CD3, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123 e glicoforina A, que também reconhecem dextran nas micropartículas. Após a incubação, são adicionadas 0,05mL de micropartículas/volume de suspensão celular final e incubadas por 10min/TA ou 5min/4°C. Após essa etapa, o volume é acertado até 3,0 mL com HBSS-SFB-EDTA e a suspensão celular é submetida ao ímã de separação por 2 vezes por 2,5 min. Na seleção positiva, o sobrenadante é

descartado e as células presas ao íman são ressuspensas em HBSS-SFB-EDTA e contadas. Na seleção negativa, o sobrenadante é coletado, contado e centrifugado. As células são ressuspensas em RPMI suplementado com 20 mM HEPES, 100 U/mL ou µg/mL de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de SFB e utilizadas de acordo com a cinética.

### 3.6.3 Isolamento de PDCs de PBMCs

O isolamento das PDCs foi realizado utilizando kits comerciais de separação magnética negativa da marca STEMCELL (ver seção 3.11.2). As PBMCs foram transferidas para tubos Falcon de 14 mL de fundo redondo e 0,03 mL e 0,05 mL por volume de suspensão celular total, do bloqueador CD32 e do coquetel de anticorpos dos kits, respectivamente, são adicionados. A suspensão é incubada por 30min/TA. Após a incubação, são adicionadas 0,2 mL de micropartículas/volume de suspensão celular final e incubadas por 10min a TA. Após essa etapa, o volume é acertado até 10,0 mL com PBS-SFB-EDTA e a suspensão celular é submetida ao íman (4°C) de separação por 2 vezes por 5 min. O sobrenadante é coletado, contado e centrifugado. As células são ressuspensas em RPMI suplementado com 20 mM HEPES, 100 U/mL ou µg/mL de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de SFB e utilizadas de acordo com a cinética.

## 3.7 Modelos de cultura *in vitro*

### 3.7.1 Estimulação de PBMCs

Após a separação, as PBMCs foram plaqueadas em meio RPMI suplementado com 20 mM HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de SFB. A concentração final das células no poço foi de  $1 \times 10^6$  células/mL e elas foram plaqueadas em placas de 48 ou 24 poços com 0,5 mL ou 1,0 mL, respectivamente. As células foram imediatamente estimuladas com MOCK (mesmo volume que o vírus), DENV-2 em diferentes MOIs (multiplicidade de infecção) ou IFN $\alpha$  150ng/mL. O bloqueio do receptor IFNAR foi realizado adicionando-se 1,0 µg/mL de anticorpo neutralizante anti-IFNAR2 30min antes de serem adicionados os estímulos. Após a 18h ou 24h, a cultura foi imunofenotipada e o sobrenadante aliquoteado e armazenado a -20°C para posterior dosagem por ELISA.

### 3.7.2 Infecção e tratamento de monócitos

Os monócitos humanos foram purificados e cultivados com meio RPMI suplementado com 20 mM HEPES, 100 U/mL e 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de SFB. O número de monócitos variou de acordo com o protocolo (200.000 a 250.000 por poço) e as células foram plaqueadas em placas de 48 poços com 0,5 mL de volume final. Os tratamentos com os recombinantes solúveis TRAIL (25-50 µg/mL) e IFN $\alpha$  (100IU/mL) foram realizados 18h antes da adsorção viral. O bloqueio do receptor IFNAR foi realizado com 1ug/mL logo após a adsorção viral por 30 min. Para a infecção viral, os monócitos foram enriquecidos, plaqueados e tratados ou não com IFN $\alpha$  e TRAIL. Após 18h em cultura, o meio foi retirado e os monócitos adsorvidos com MOCK ou DENV-2 MOI 10 por 90min a 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Para os experimentos de neutralização do DENV-2, 15 µg/mL do anticorpo anti-DENV-2 específico 3H5 foi incubado com DENV2 MOI 10 a 4°C por 60min, sendo utilizado posteriormente como inóculo viral. Após 24h ou 48h, os monócitos foram recuperados, Imunofenotipagem e marcados para o antígeno viral.

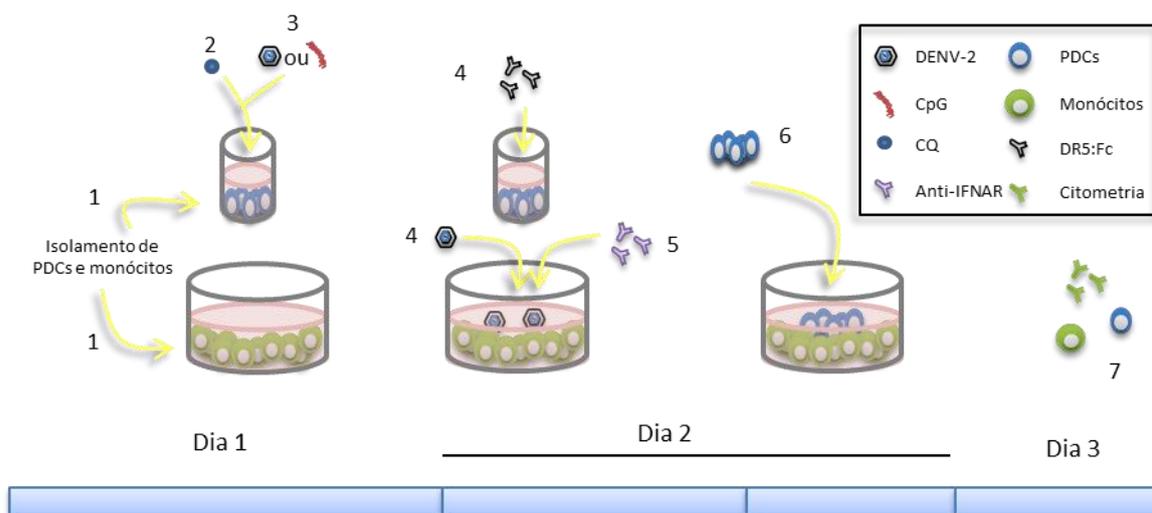
### 3.7.3 Estimulação das PDCs

As PDCs foram purificadas e plaqueadas em placas de 96 poços em quantidades variadas (5.000 – 25.000 - 50.000) com 0,1 mL meio RPMI suplementado com 20 mM HEPES, 100 U/mL e 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de SFB. O tratamento com 5 µM de cloroquina foi realizado 60 min antes da estimulação viral em estufa 37°C/5%CO<sub>2</sub>. Após esse período, os diversos estímulos foram adicionados às culturas: MOCK, DENV-2 (em MOIs variados), 5 µM de CpG A ODN2216 ou DENV-2 neutralizado com anticorpo 3H5. Após 24h ou 48h de incubação, as PDCs foram imunofenotipadas ou utilizadas nas coculturas com os monócitos.

### 3.7.4 Modelos de coculturas autólogas

A realização de coculturas envolveu a interação de PDCs (células e sobrenadante) ativadas ou não com as culturas de monócitos infectados, como descrito na ([Figura 3.2](#)). No dia 1, ambas as células foram purificadas como descrito no item 3.6. As PDCs foram pré-tratadas com cloroquina por 60 min e em seguida foram estimuladas com CpG A ODN2216 (ou DENV2 MOI 20, quando indicado) ou mantidas em meio (não estimuladas). No dia 2 (após 18h), os monócitos foram

adsorvidos com DENV-2 MOI 10 (como descrito no item 3.10.2), e durante a adsorção viral (90min), as PDCs foram tratadas com moléculas neutralizantes para TRAIL (DR5:Fc solúvel – 10 µg/mL; monoclonal anti-TRAIL - 10 µg/mL) e para IFNα solúvel (monoclonal anti-IFNα - 10 µg/mL). Após o final da adsorção viral, as culturas de monócitos tiveram todo inóculo removido e o meio foi repostado para o volume final de 0,5mL. O bloqueio do IFNAR nos monócitos foi realizado após a adsorção viral com adição do anticorpo neutralizante (monoclonal anti-IFNAR2 – 1 µg/mL) a cultura, com incubação por 30min. Após esse período, as culturas de PDCs foram adicionadas às culturas de monócitos. No caso da adição somente do sobrenadante das culturas de PDCs, as PDCs foram centrifugadas e 0,1mL do sobrenadante foi adicionado às culturas de monócitos. Diversas taxas de PDCs:monócitos ( $\times 10^3$  células) foram utilizadas: 50:250; 50:200; 5:200 e 25:225. No dia 3 ou 4, as coculturas foram recolhidas, imunofenotipadas e marcadas para o antígeno viral intracelular e o sobrenadante armazenado para posterior análise.



**Figura 3.2: Modelo de cocultura autóloga de IKPDCs e monócitos infectados.**

(1) PDCs e monócitos foram purificados e em seguida (2) as PDCs foram pré-tratadas ou não com cloroquina (CQ - 5µM) por 60 min e na sequência, (3) estimuladas com CpG ODN 2216 5µM (ou DENV2 MOI 20) por 18h. (4) O inóculo viral de DENV foi adsorvido a cultura de monócitos por 90min, enquanto (4) as PDCs foram tratadas com DR5:Fc, anticorpo anti-TRAIL ou anticorpo anti-IFNα. Após a adsorção viral, (5) os monócitos foram tratados anticorpo anti-IFNAR por 30min. Em seguida, (6) as culturas de PDCs foram adicionadas às culturas de monócitos e analisadas (7) por citometria de fluxo 24h ou 48h após a infecção.

## 3.8 Citometria de Fluxo

### 3.8.1 Imunofenotipagem de células de pacientes

As PBMCs de pacientes e controles saudáveis foram descongeladas em SFB puro e lavadas em PBS-SFB-EDTA por centrifugação a 350g por 10min a 10°C. Para as marcações das PDCs, as células descongeladas foram contadas e aproximadamente  $2 \times 10^6$  PBMCs foram fenotipadas. As PBMCs foram marcadas com coquetel de anticorpos CD123-FITC, TRAIL-PE, CD14-PerCP, BDCA4-APC, CD4-APC.Cy7 e CD3-PacificBlue e controle isotípico; também foram bloqueadas com CD32 (FcRII) por 20min a 4°C. Para as marcações das células NK, as PBMCs foram primeiramente bloqueadas com PBS-SFB-EDTA contendo 5% de plasma humano inativado por 30min a 4°C. Logo em seguida, as células foram marcadas com um coquetel de CD16-FITC, TRAIL-PE, CD56-PE.Cy5.5, CD8-PE.Cy7, CD107a-eFluor660, CD4-APC.AlexaFluor750 e CD3-PacificBlue por 20min a 4°C. Após lavagem com PBS-SFB-EDTA a 350g a 10°C, as células foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 2% (PFA) e lidas em até 24h após a marcação. A marcação com TLR3-PE intracelular foi realizada após permeabilização com PBS-BSA-EDTA-SAP, contendo 0,015% de saponina, conforme descrito abaixo.

### 3.8.2 Marcação de antígenos de superfície das células em cultura

As células foram recuperadas mecanicamente por ressuspensão da cultura e raspagem suave. A centrifugação das células foi realizada a 4°C e usando 350g como velocidade. O sobrenadante foi recuperado após centrifugação da suspensão celular raspada e armazenado a -20°C. As marcações dos antígenos de superfície foram realizadas utilizando primeiramente o bloqueador CD32 (STEMCELL), no caso das culturas de PDCs ou, no caso dos outros tipos celulares, solução de bloqueio (PBS-SFB-EDTA contendo 5% de plasma humano inativado) por 30min/4°C. Após lavagem com PBS-SFB-EDTA, as células foram marcadas com os coquetéis específicos de anticorpos e seus isotipos por 20-30min/4°C. As células foram fixadas com PFA por 20min a 4°C e lidas em até 24h no citômetro de Fluxo.

### 3.8.3 Marcação para apoptose das células em culturas

No caso de marcação para apoptose, logo após o bloqueio, as células foram lavadas 2 vezes com 0,4mL de "binding buffer" e lavadas. Para um volume final de 0,1mL de binding buffer na suspensão celular, foram adicionados 10µM de TOPRO-

3 e 0,001mL de AnexinaV-PE, além do anticorpo CD14-Pacific Blue. As células foram incubadas por 30min/4°C e em seguida, lavadas e lidas em citômetro de fluxo em até 120min após a marcação.

### **3.8.4 Marcação de antígenos intracelulares das células em cultura**

No caso de marcação para antígeno intracelular, após a fixação, as células foram permeabilizadas com duas lavagens em PBS-BSA-EDTA-SAP, contendo 0,15% de saponina. Após a incubação com solução de bloqueio, as células foram lavadas e incubadas com anticorpos anti-TLR3-PE ou anticorpo anti-flavivírus 4G2-PE ou anti-DENV conjugado a AlexaFluor® 647. A conjugação do anticorpo foi realizada utilizando kits comerciais da Molecular Probes pelo método de Zenon ou por conjugação direta ao fluorocromo com posterior purificação em coluna de resina. As incubações dos anticorpos intracelulares com as células duraram 60min/4°C. Após lavagem em PBS-BSA-EDTA-SAP, as células foram fixadas com PFA e lidas em até 24h no citômetro de fluxo.

Para marcação intracelular da linhagem celular C6/36, as células foram ressuspendidas mecanicamente por raspagem, as células foram lavadas em PBS-BSA e permeabilizadas com PBS-BSA-EDTA-SAP por 10min/4°C. Em seguida, as células foram marcadas com anti-DENV purificado por 60 min/4°C e após lavagem, com anti-camundongo marcado com AlexaFluor®488 por 30 min/4°C. As células lavadas foram fixadas com PFA e lidas em citômetro de fluxo.

### **3.8.5 Equipamentos e programas de análises**

Os seguintes citômetros da BD foram utilizados: Accuri C6, FACS Canto II, FACS Aria III e BD LSR III, sendo os dois últimos pertencentes às plataformas de citometria do IOC e do Institut Pasteur, em Paris/França, respectivamente. Os programas CFlow e FACS Diva (BD Biosciences) foram utilizados para a aquisição das amostras. O programa FlowJo versão 7.6.5 (Treestar) foi utilizado para todas as análises e compensações dos arquivos de citometria de fluxo.

### 3.9 Imunofluorescência e microscopia tridimensional

As culturas enriquecidas de PDCs e de monócitos foram, após cinéticas específicas, plaqueadas em lamínulas cilíndricas e pré-tratadas com poli-lisina, como descrito a seguir. Poli-lisina (0,15 mL) na concentração final de 0,033% (peso/volume) foi utilizada para tratamento das lamínulas. Após 60min de incubação a TA, as lamínulas foram rinsadas com água destilada e secas à TA. As lamínulas tratadas foram conservadas a 4°C, em local limpo. Para aderência das populações celulares, a suspensão celular adicionada às lamínulas foi incubada em estufa de 37°C por 120 min. O excesso de meio e as células não aderidas foram lavados com 0,15 mL de PBS. As células foram fixadas com PFA 4% por 20min/TA. Após lavagem com PBS, as células foram tratadas com glicina 0,1M diluída em PBS por 5min a TA. As células foram permeabilizadas com 3 lavagens de 0,15mL de PBS-SAP 0,1%. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com a mesma solução de bloqueio utilizada na citometria de fluxo (0,1mL) e as lamínulas foram incubadas por 30min a TA. Após lavagens, as células foram marcadas com anti-DENV purificado ou anti-TRAIL humano (ambos os anticorpos murinos) e incubadas por 60min a TA. Após lavagens, as células foram marcadas com anticorpo anti-murino Cy3 feito em macaco. As células foram lavadas e tratadas com DAPI (1ug/mL). Após lavagem e secagem rápidas, as lamínulas foram montadas com Fluoromount<sup>®</sup> em lâminas. As lâminas foram mantidas no escuro a 4°C até a leitura.

As lâminas foram escaneadas com microscópio Nikon Eclipse 90i usando uma objetiva por imersão em óleo de aumento 100x Plan Apo VC piezo (NA 1.4) e blocos de filtros Chroma (ET-DAPI e ET-Cy3). As imagens foram submetidas a deconvolução usando o algoritmo de Meinel e 8 iterações, usando o software Metamorph (MDS Analytical Technologies) na plataforma de imagem da Nikon do Institut Marie Curie, em Paris/França. Para analisar as imagens 3D, foram realizadas sobreposições das imagens obtidas para Cy3/DAPI/Trans e a ferramenta do software ImageJ (NIH) “3D interactive surface plot”. Para quantificar a fluorescência do TRAIL e do DENV, foi utilizada a ferramenta “measure and label”.

### 3.10 Detecção de citocinas

Todos os sobrenadantes de cultura *in vitro* ou amostras de plasma de fase aguda de pacientes e controles foram armazenados para posterior detecção a -20°C e -70°C, respectivamente. Kits comerciais para a detecção de IFN $\alpha$  (PBL International) e TRAIL (R&D Systems) solúvel foram utilizados e foram seguidas as instruções conforme os fabricantes. A detecção de IL12 foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (BD) e IL15 (R&D Systems).

### 3.11 Análises estatísticas

As análises de todos os dados provenientes de células ou plasmas de pacientes foram analisadas utilizando o teste não pareado e não paramétrico de Mann-Whitney, em que  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo. As análises dos dados obtidos nos experimentos *in vitro* foram todas submetidas ao teste T pareado, em que  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo. Para todas as análises de correlação foi utilizado o teste não paramétrico de Spearman (two-tailed, com intervalo de confiança de 95%). O cálculo dos testes estatísticos foi realizado no programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad Software, La Jolla, EUA).

## 4 Resultados

---

### 4.1 Ativação de PDCs circulantes e produção de fatores solúveis durante a febre da dengue

Nessa investigação foi estudado um grupo de pacientes com dengue na fase aguda, que foram classificados de acordo com as orientações da OMS 2009, conforme descrito na seção 3.2. Nessa primeira etapa, foram analisadas amostras de 43 pacientes, sendo 33 classificados como dengue brando (CA - com sinais de alerta e SA - sem sinais de alerta) e 10 como pacientes graves (Dengue Grave). Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais estão sumarizados na Tabela 4.1. Entre os dois grupos, não houve diferenças estatísticas significantes entre idade, sexo, febre, ou outros sintomas. Observamos, porém, uma maior frequência de trombocitopenia e hemoconcentração nos casos graves. Não foram observadas grandes diferenças entre a contagem de leucócitos e os valores de hematócritos médios, porém foram encontrados nos pacientes mais graves um aumento dos valores de hematócrito concomitante à queda de plaquetas, assim como, maiores valores de enzimas hepáticas. Os casos graves apresentaram maior frequência de dor abdominal persistente, vômitos incoercíveis e derrames (pericárdico ou pleural ou ascites).

**Tabela 4.1: Informações demográficas, clínicas e laboratoriais sobre o estudo de PDCs em pacientes com dengue**

| <b>Características</b>  | <b>FDSA e FDCA<sup>2</sup></b> | <b>(N)</b> | <b>Dengue Grave</b> | <b>(N)<sup>3</sup></b> |
|---|--------------------------------|------------|---------------------|------------------------|
| <b>Idade (mediana, 25-75%)</b>  | 43,26-58                       | (33)       | 42,24-50            | (10)                   |
| <b>Sexo (M:F; número de pacientes)</b>  | 14:19                          | (31)       | 5:5                 |                        |
| <b>Febre</b>  | 87%                            | (31)       | 90%                 | (10)                   |
| <b>Hospitalização</b>   | 52%                            | (31)       | 100%                | (8)                    |
| <b>Manifestações hemorrágicas (mucosa)<sup>4</sup></b>                        | 16%                            | (25)       | 30%                 | (10)                   |
| <b>Vômitos constantes</b>   | 8%                             | (25)       | 50%                 | (6)                    |
| <b>Dor abdominal persistente</b>  | 8%                             | (25)       | 60%                 | (5)                    |
| <b>Hipotensão<sup>5</sup></b>   | 4%                             | (26)       | 25%                 | (8)                    |
| <b>Derrames<sup>6</sup></b>   | 0%                             | (33)       | 40%                 | (10)                   |
| <b>Contagem de plaquetas (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)<sup>7</sup></b>     | 172±37                         | (33)       | 40±12               | (9)                    |
| <b>Trombocitopenia (&lt;50x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>                | 18%                            | (33)       | 78%                 | (9)                    |
| <b>Hematócrito</b>  | 41±1%                          | (30)       | 42±4%               | (9)                    |
| <b>Hemoconcentração<sup>8</sup></b>   | 33%                            | (30)       | 56%                 | (9)                    |
| <b>Dengue anterior (IgG positivo)</b>   | 79%                            | (30)       | 100%                | (8)                    |
| <b>Aumento rápido no hematócrito concomitante a queda brusca de plaquetas</b> | 13%                            | (31)       | 60%                 | (10)                   |
| <b>Contagem de leucócitos (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)<sup>7</sup></b>    | 4028±522                       | (27)       | 3818±571            | (8)                    |
| <b>ALT (U)<sup>7</sup></b>  | 52±10                          | (23)       | 2784±2685           | (8)                    |
| <b>AST (U)<sup>7</sup></b>  | 73±16                          | (23)       | 670±611             | (9)                    |

<sup>1</sup> População de estudo com 43 pacientes.

<sup>2</sup> FDSA (Febre do dengue sem sinais de alerta) e FDCA (Febre do dengue com sinais de alerta; Dengue grave de acordo com OMS (421).

<sup>3</sup> Número de pacientes com informação disponível durante a hospitalização.

<sup>4</sup> Manifestações hemorrágicas (epistaxe, gengivorragia, metrorragia, tosse com catarro sanguinolento).

<sup>5</sup> Hipotensão postural com queda na pressão arterial sistólica em 20mmHg na posição supino ou pressão arterial sistólica menor que 90mmHg.

<sup>6</sup> Derrame pleural ou pericárdico ou ascite.

<sup>7</sup> Média ± erro padrão do número mínimo de plaquetas e leucócitos registrados e do valor máximo de hematócrito ou ALT/AST.

<sup>8</sup> Hematócrito elevado (20% durante o curso da doença ou maior que 45% para homens ou maior que 41% para mulheres).

Para determinar o estado de ativação das PDCs, ou seja, a presença de IKPDCs nos pacientes, foi observado a presença do TRAIL em sua membrana, que como já foi relatado, caracteriza as PDCs fenotipicamente como IKPDCs. As PBMCs foram imunofenotipadas por análise em citometria de fluxo e sendo que a região das PDCs foi determinada de acordo com a [Figura 4.1.A](#). Na análise, todas as PBMCs foram selecionadas e uma região no gráfico CD14 x CD4 foi traçada de modo a excluir todas as células positivas para CD14, ou seja, excluindo a população de monócitos. Em seguida, dois marcadores, CD123 e BDCA4, definiram a população positiva de PDCs estudadas. As células selecionadas na região “PDC” são também CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>. As PDCs do sangue periférico são as únicas a expressar BDCA4 e PDCs

ativadas diminuem a expressão de BDCA2 motivo pelo qual decidiu-se utilizar o BDCA4 para caracterizar as PDCs.

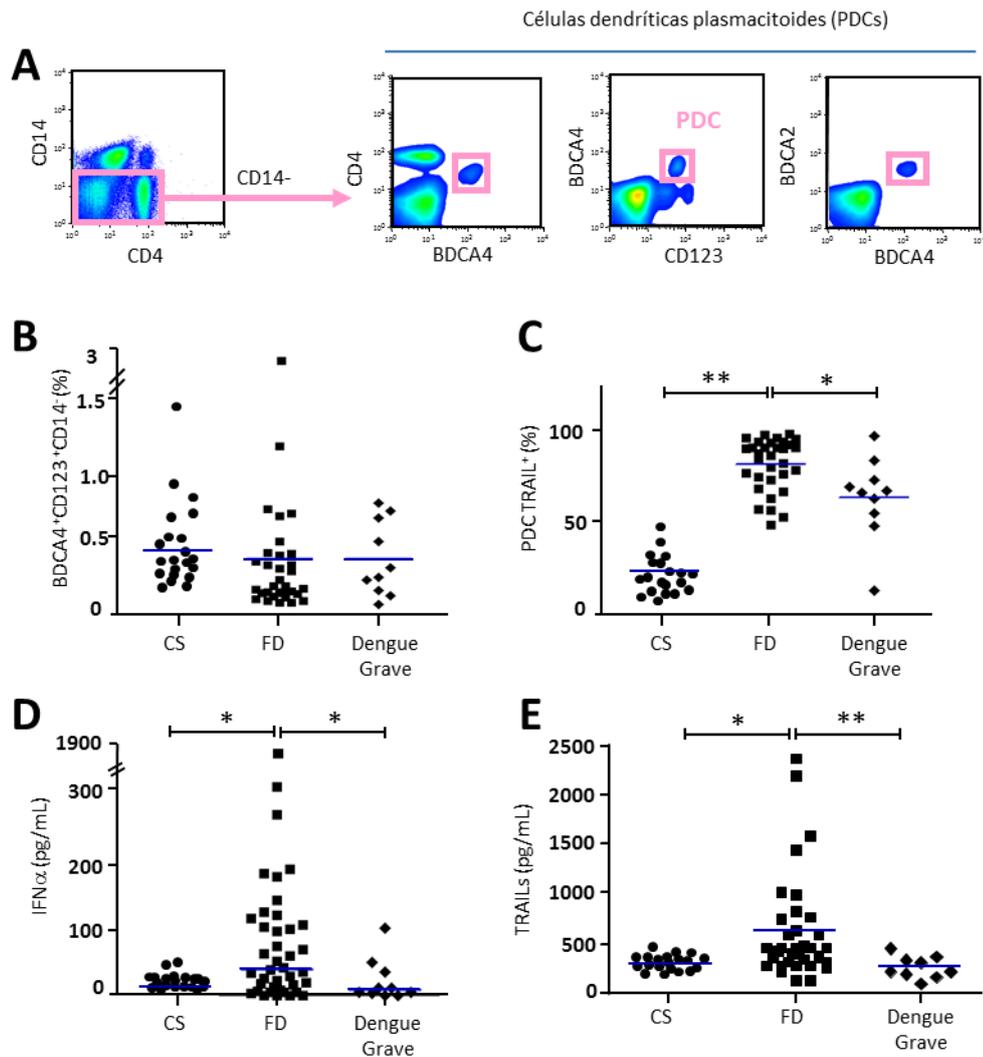
Ao se analisar 33 pacientes FD (SA e CA) e comparando-os com 10 casos de Dengue Grave e 20 controles saudáveis, observa-se que a frequência das PDCs CD14<sup>-</sup>BDCA4<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup> ([Figura 4.1.B](#)) não difere estatisticamente entre os grupos estudados, sendo obtido valores de mediana 0,47% - 0,39% - 0,39%; respectivamente para controles saudáveis (CS), FD e Dengue Grave. Observamos também que os valores de frequência obtidos, em sua maioria estão dentro da faixa de porcentagem de PDCs entre células mononucleares que é de 0,2 a 0,8%, como descrito na literatura (422). Não encontramos nenhuma diferença significativa quando calculados os valores absolutos das PDCs entre os grupos estudados.

Analisando-se a expressão de TRAIL na membrana das PDCs ([Figura 4.1.C](#)), observamos que, os pacientes apresentaram um maior número de PDCs TRAIL positivas que os controles saudáveis. O grupo dos pacientes FD apresentou um número significativamente maior de PDCs TRAIL<sup>+</sup> (mediana 88,5%; n=30) que o grupo controle (mediana 36,90%; n=20;  $p=0,0023$ ) ou grupo Dengue Grave (mediana 68,40%; n=10;  $p=0,0261$ ). Assim, um maior número de PDCs ativadas ou com fenótipo de IKPDCs foi encontrado em associação com casos mais brandos de FD.

Considerando que as PDCs podem produzir até 1000 vezes mais IFN $\alpha$  que outros tipos celulares (135), e que essa molécula possui propriedades antivirais contra o DENV (293), foram determinados os níveis no plasma de pacientes com dengue durante a fase aguda ou febril ([Figura 4.1.D](#)). Foi detectada uma maior produção de IFN $\alpha$  no grupo FD (mediana 39,0 pg/mL; n=33) estatisticamente significativa quando comparada aos controles saudáveis (mediana 15,0 pg/mL; n=20,  $p=0,05$ ) e aos casos de Dengue Grave (mediana 7,9 pg/mL; n=10,  $p=0,05$ ). Observamos também uma correlação positiva entre os níveis de IFN $\alpha$  e a porcentagem de PDCs TRAIL<sup>+</sup> nos pacientes (Spearman  $r=0,36$ ;  $p=0,042$ ).

O TRAIL pode ser considerado um gene estimulado por IFNs do tipo I, que estimulam a produção de TRAIL solúvel (208). Além disso, o TRAIL solúvel possui propriedades antivirais contra a replicação do DENV (117). Por essas razões, foi detectado também o nível de TRAIL solúvel nos grupos de pacientes ([Figura 4.1.E](#)). Do mesmo modo que as PDCs TRAIL<sup>+</sup> e os níveis de IFN $\alpha$ , os níveis de TRAIL

solúvel foram mais elevados nos plasmas do grupo de pacientes brandos (mediana 678 pg/mL; n=33) quando comparado ao grupo saudável (315 pg/mL; n=20;  $p=0,01$ ) ou ao grupo grave (314,6 pg/mL; n=9;  $p=0,007$ ). Uma correlação positiva significativa foi encontrada entre os níveis de TRAIL solúvel e a porcentagem de PDCs TRAIL<sup>+</sup> (Spearman  $r=0,6$ ;  $p=0,0007$ ).



**Figura 4.1: Perfil de ativação de células dendríticas plasmacitoides (PDCs) e fatores solúveis IFN $\alpha$  e TRAIL em pacientes com Febre do Dengue.**

As PBMCs e plasma de pacientes de fase aguda foram analisados por citometria de fluxo e ELISA, respectivamente. **(A)** Estratégia de seleção da região para analisar as PDCs em PBMCs totais: exclusão de células CD14<sup>+</sup> e visualização das PDCs CD4<sup>+</sup>BDCA4<sup>+</sup> ou CD123<sup>+</sup>BDCA4 ou BDCA4<sup>+</sup>BDCA2<sup>+</sup>. **(B)** Frequência de PDCs BDCA4<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> e **(C)** porcentagem dessa população expressando TRAIL para os seguintes grupos: controles saudáveis (CS), pacientes com FD (SA+CA) e Dengue Grave. Níveis plasmáticos de IFN- $\alpha$  **(D)** e TRAILs **(E)** obtidos para os mesmos grupos de pacientes acima. Cada ponto representa um indivíduo e valores de medianas são exibidos como linhas azuis. Valores foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney em que \*  $p<0.05$  e \*\* $p<0.005$ .

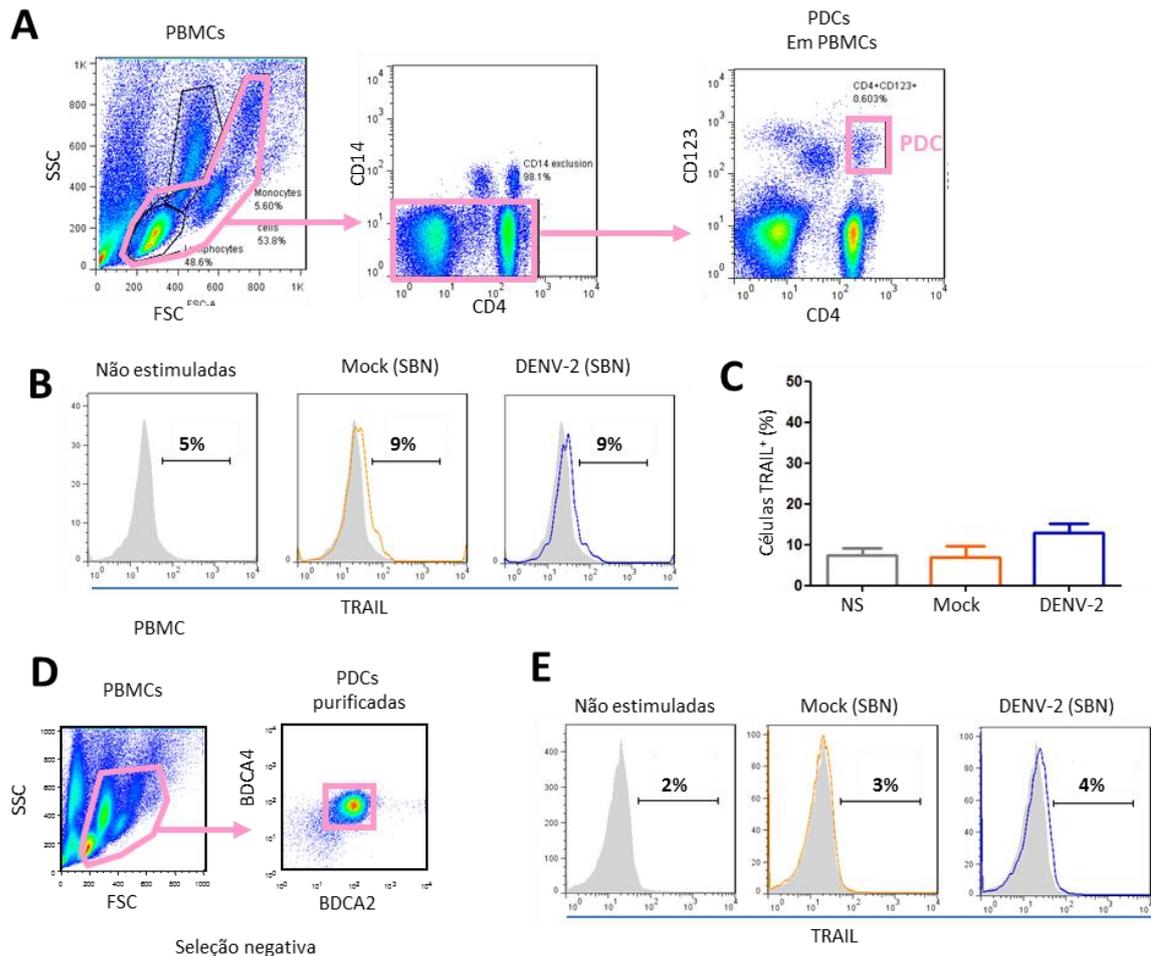
Assim sendo, estes resultados apontam uma provável associação protetora entre as PDCs TRAIL<sup>+</sup> e os níveis elevados de IFN $\alpha$  e TRAIL solúvel durante a dengue.

## 4.2 As PDCs durante a estimulação *in vitro* com DENV-2

### 4.2.1 Ativação de PDCs pelo DENV-2

Sabe-se que PDCs podem reconhecer o DENV-2 *in vitro* através da via de endocitose e o reconhecimento pelo TLR7 (74), porém é desconhecido se o vírus é capaz de induzir diretamente a diferenciação de PDCs em IKPDCs, assim como observado com HIV e HTLV. Desse modo, foi utilizado o modelo de estimulação *in vitro* em PBMCs humanas, que consiste em observar os efeitos da adição de DENV-2 obtido do sobrenadante de culturas infectadas de células C6/36 (SBN). A população de PDCs foi selecionada utilizando estratégia similar à utilizada com as células de pacientes (Figura 4.2.A). As PDCs em geral se encontram na região limite entre os linfócitos e monócitos, portanto espera-se sempre uma pequena marcação de CD14 com essa estratégia de região, que é eliminada com a estratégia de exclusão de CD14 versus CD4. As PDCs foram, então, selecionadas utilizando o marcador CD123 versus CD4 e posteriormente, confirmada a expressão de BDCA4 das células selecionadas.

Na primeira abordagem, o DENV-2 (SBN) e o MOCK (SBN) foram adicionados às culturas de PBMCs recém-isoladas e, após 18h, a expressão de TRAIL na superfície celular (TRAIL<sub>m</sub>) das PDCs foi analisada por citometria de fluxo (Figura 4.2.B). Como indicado na Figura 4.2.C, não foi observada uma diferença significativa na expressão de TRAIL<sub>m</sub> nas PDCs (PDCs TRAIL<sup>+</sup>) tratadas com MOCK (SBN) (média 6,8%, n=3) ou DENV-2 (SBN) (média 12,8%, n=3), em relação às células não estimuladas (NS) (média 7,4%, n=3). Assim, para eliminar a interferência das outras PBMCs na cultura, foi realizado o enriquecimento de PDCs utilizando uma seleção magnética negativa com kits comerciais (STEMCELL) em que uma população de PDCs com pouca contaminação com outros tipos celulares (células T CD4) é obtida com rendimento de aproximadamente 90% de células BDCA2<sup>+</sup>BDCA4<sup>+</sup> (Figura 4.2.D). Entretanto, esse modelo de PDCs purificadas estimuladas com DENV-2 (SBN) (n=1) por 18h não foi aparentemente relevante já que não apresentou uma população TRAIL<sup>+</sup> (Figura 4.2.E).



**Figura 4.2: Células dendríticas plasmacitoides TRAIL positivas durante estimulação pelo DENV-2 (sobrenadante de cultura).**

As PBMCs de doadores saudáveis foram estimuladas por 18h com DENV-2 obtido do sobrenadante de culturas de linhagem celular C6/36 infectadas (SBN). As células foram fenotipadas por citometria de fluxo **(A)** para os antígenos superficiais CD4, CD3, CD14, BDCA4, CD123 e TRAIL e analisadas na região “PDCs” CD14<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> BDCA4<sup>+</sup>. **(B)** Perfil de expressão de TRAIL membranar em populações de PDCs selecionadas em **A** e **(C)** porcentagem de PDCs TRAIL<sup>+</sup> (n=3) e estimulação de MOCK (SBN) (laranja), DENV-2 (SBN) (azul) ou sem estímulo (cinza). **(D)** PDCs enriquecidas por seleção negativa com microesferas magnéticas (STEMCELL) expressando BDCA2 e BDCA4 e **(E)** estimuladas com MOCK (SBN) (laranja), DENV-2 (SBN) (azul) ou sem estímulo (cinza) (n=1).

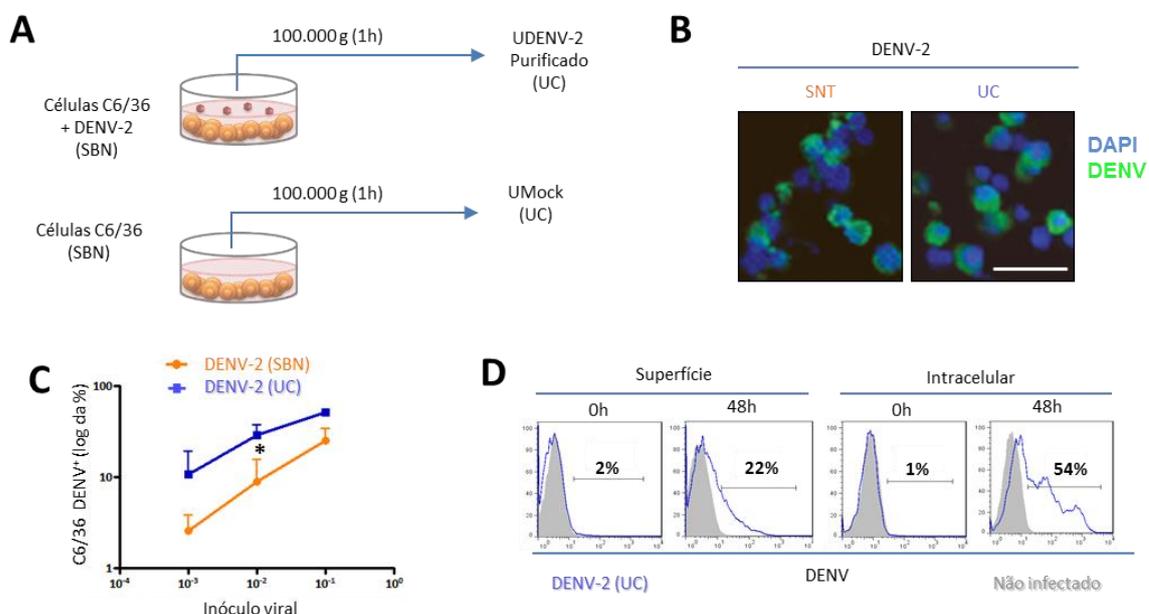
Para observar se a expressão de TRAIL nas PDCs é ligada a quantidade de partículas virais no inóculo viral, foi realizada a metodologia de concentração da massa viral por ultracentrifugação com explicado no item 3.5.4 e exemplificado na [Figura 4.3.A](#). Por esse método, é removido 99% do sobrenadante de cultura celular que não sedimenta a 100.000g e também são removidas da suspensão viral ultracentrifugada as partículas maiores que 0,22 µm (filtração em membrana).

Para testar se o procedimento de concentração da massa viral preservou a infectividade do inóculo viral após o procedimento, foram realizados diversos

ensaios de infecção em células de mosquito C6/36. Primeiramente, observamos a replicação viral obtida por imagens de imunofluorescência (Figura 4.3.B), quando utilizamos a mesma diluição do inóculo viral para adsorver na linhagens celulares ( $10^{-3}$ ). Em ambas as imagens, observamos a detecção do antígeno viral em verde, sugerindo que a capacidade replicativa da massa viral ultracentrifugada não sofre perda expressiva.

Em seguida, em diferentes diluições do inóculo original (Figura 4.3.C), observamos que, em 48h após a adsorção, a massa viral ultracentrifugada apresenta maior detecção de antígenos virais principalmente na diluição  $10^{-2}$  (média  $\pm$  erro padrão:  $28,7 \pm 8,8\%$  comparado a  $8,9 \pm 6,5\%$ ;  $n=3$ ,  $p=0,01$ ).

Para confirmar que a detecção de antígenos virais do inóculo ultracentrifugado é referente à replicação viral e não à adsorção das partículas virais nas células (Figura 4.3.D), a marcação de antígenos virais foi realizada logo após a adsorção viral (0h) com permeabilização celular (intracelular) ou sem permeabilização (extracelular). Os antígenos virais foram observados somente após 48h em ambos os métodos de marcação (54% e 22%, respectivamente). Esses dados indicam que a ultracentrifugação é capaz de concentrar a massa viral e que o vírus ultracentrifugado mantém a infectividade.



#### Figura 4.3: Massa viral ultracentrifugada: preparação e infectividade.

As células da linhagem C6/36 de *Aedes albopictus* foram adsorvidas com DENV-2 (16681) ou não e o sobrenadante foi recolhido 8 dias após a infecção. **(A)** Após a remoção dos debris celulares por centrifugação a 1000g, o sobrenadante foi alíquotado e armazenado a -80°C diretamente ou ultracentrifugado por 1 hora a 100.000g. O pellet foi ressuscitado, filtrado a 0,22µm e armazenado a -80°C nas mesmas condições da massa viral não ultracentrifugada. **(B)** Células C6/36 foram infectadas por 48h com a mesma diluição dos inóculos ( $10^{-3}$ ) do vírus não ultracentrifugado (SBN), à esquerda, e ultracentrifugado (UC), à direita. As células foram marcadas por imunofluorescência com anti-DENV (verde) e o núcleo foi corado com o intercalante DAPI (azul). As células positivas para o DENV foram detectadas em ambas as imagens. A barra branca representa 25 µm. **(C)** Porcentagem de células C6/36 positivas para DENV por citometria de fluxo em diferentes diluições dos inóculos de vírus ultracentrifugado (linha azul) e não ultracentrifugado (linha laranja) (n= 3). **(D)** Antígenos virais do DENV-2 foram analisados por citometria de fluxo com (intracelular) ou sem (superficial) permeabilização em diferentes tempos após adsorção viral (0h e 48h) usando o DENV-2 ultracentrifugado (linha azul) e C6/36 não infectadas como controle negativa (linha cinza) (n=1). Valores foram submetidos ao teste t pareado em que \* p < 0,05.

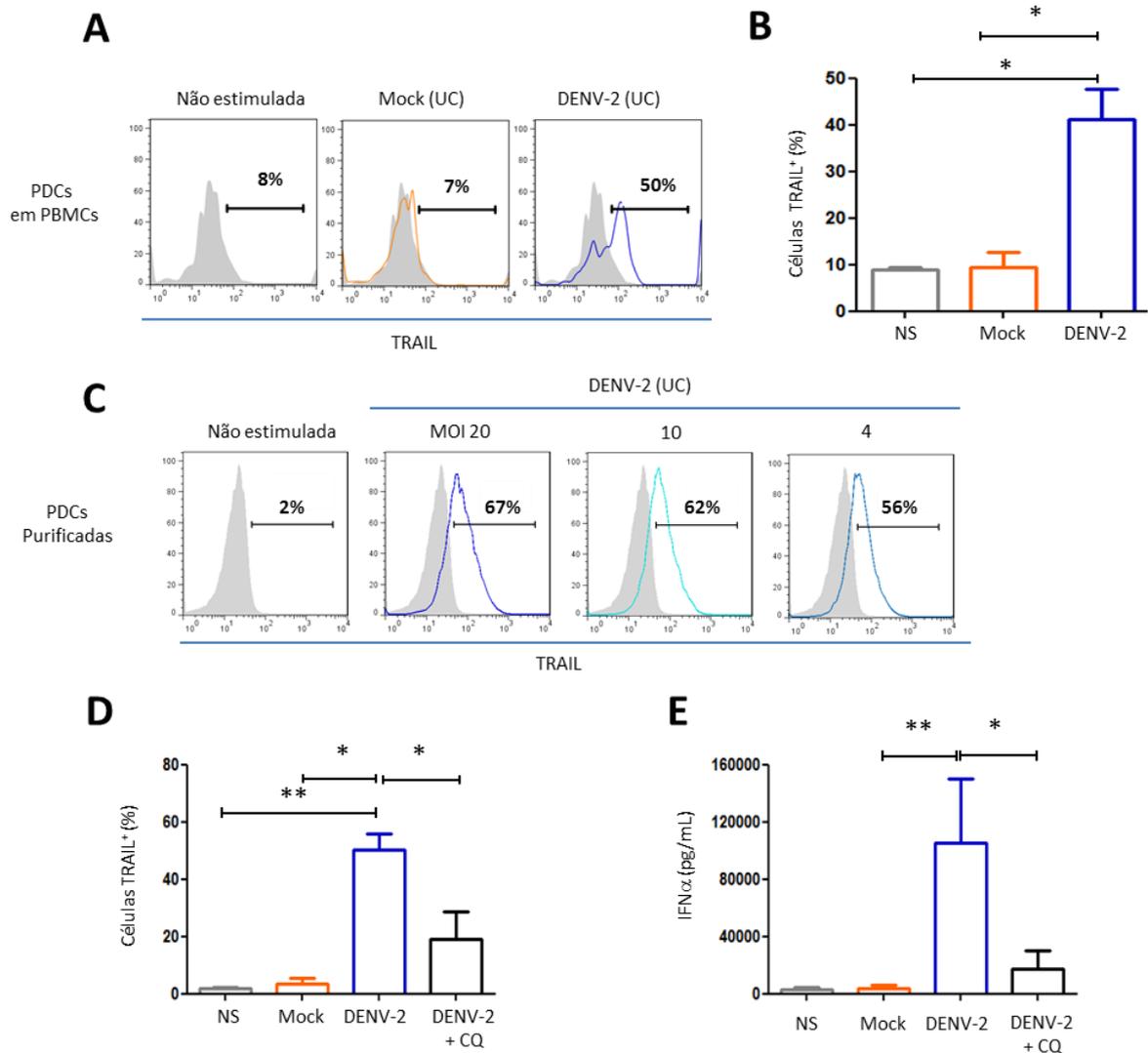
Assim, primeiramente testamos a massa viral ultracentrifugada DENV-2 (UC) em PBMCs recém-isoladas e observamos a expressão de TRAIL na superfície das PDCs por citometria de fluxo (Figura 4.4.A). Na Figura 4.4.B, observa-se uma diferença significativa de PDCs  $CD4^+CD3^-CD14^-BDCA4^+CD123^+$  e  $TRAIL^+$  nas culturas de PBMCs estimuladas com DENV-2 (média ± erro padrão:  $41,1 \pm 6,5\%$ ; n=3), quando comparado às culturas não estimuladas ( $9,4 \pm 3,3 \%$ ; n=3,  $p=0,04$ ) e ao MOCK (UC) ( $8,8 \pm 0,6\%$ ; n=3,  $p=0,04$ ).

Com o intuito de confirmar a influência da carga viral na expressão de TRAIL nas PDCs, e excluir a ativação por citocinas produzidas por outras células, as PDCs foram purificadas e estimuladas diretamente com DENV-2 (UC) ou MOCK (UC) por 18h. A Figura 4.4.C mostra a estimulação de PDCs purificadas com diversos MOIs (multiplicidades de infecção) de 10 a 4. Para esse doador de PBMCs, em todos os MOIs utilizados, observou-se um número significativo de PDCs  $TRAIL^+$ . Entretanto no segundo doador utilizado, apenas o MOI de 20 foi capaz de induzir a expressão de TRAIL nas PDCs (MOI 20 – 53,5%; MOI 10 – 3,5%; MOI 4 – 3,8%; e Mock – 7%). Dessa maneira, a expressão de TRAIL nas PDCs foi considerada dependente da dose viral, ou seja, quanto maior o MOI utilizado, maior a taxa de detecção de PDCs  $TRAIL^+$ .

Assim, o MOI 20 do DENV-2 (UC) foi escolhido para os experimentos seguintes com PDCs purificadas (Figura 4.4.D e E). A frequência de PDCs  $TRAIL^+$  em culturas estimuladas com DENV-2 (UC) (média ± erro padrão:  $50,3 \pm 5,4\%$ ; n=4) foi significativamente maior quando comparado ao Mock (UC) ( $3,6 \pm 1,8\%$ ; n=4,  $p=0,02$ ) e também às PDCs não estimuladas ( $1,9 \pm 0,4\%$ , n=4,  $p=0,003$ ). Foram analisados outros parâmetros de ativação das PDCs com a expressão de HLA-DR e CCR7, porém não foram detectadas diferenças significativas para os diversos

estímulos utilizados tanto para CCR7 (média  $\pm$  erro padrão: DENV-2 –  $25 \pm 8,5\%$  e MOCK –  $9,7 \pm 5,3\%$ ; n=3), quanto para HLADR (média  $\pm$  erro padrão: DENV-2 –  $570 \pm 320,4$  MFI e MOCK –  $459 \pm 262$  MFI; n=3). Foi analisada também a produção de IFN $\alpha$  pelas PDCs estimuladas (Figura 4.4.E). Observou-se uma robusta e significativa produção da citocina pelas culturas estimuladas com DENV-2 (média  $\pm$  erro padrão:  $117 \pm 33$  ng/mL) em relação ao MOCK (menos de 10 ng/mL, n=4,  $p=0,004$ ).

Para investigar o envolvimento da via endossomal na expressão de TRAIL e produção de IFN $\alpha$  induzidos pela estimulação com DENV-2, foi utilizada como inibidor a cloroquina. Essa droga é uma aminoquinolona já utilizada no tratamento da malária que é uma base fraca e pode se acumular nos endossomos, diminuindo seu pH. O tratamento com a cloroquina antes da estimulação viral em PBMCs não foi suficiente para bloquear a expressão de TRAIL das PDCs nas culturas de PBMCs (inibição de 37% e 0% para n=2). Entretanto, quando administrada em PDCs purificadas (Figura 4.4.D), a cloroquina é capaz de inibir em média 61% (erro padrão 18,34%) da expressão de TRAIL induzida pelo DENV-2 quando comparada às culturas sem tratamento com a cloroquina ( $p=0,047$ ). O mesmo fenômeno é observado em relação aos níveis de IFN $\alpha$  (Figura 4.4.E), pois o tratamento com a cloroquina exibe níveis reduzidos da citocina ( $25 \pm 15$  ng/mL; n=3;  $p=0,05$ ) em relação a estimulação somente com DENV-2. Esses resultados sugerem que as partículas virais do DENV-2 podem ativar as PDCs diretamente e que esse fenômeno, dependente da via endocítica, culmina na produção de IFN $\alpha$  e expressão de TRAIL membranar.



**Figura 4.4: Células dendríticas plasmacitoides TRAIL positivas e produção de IFN $\alpha$  durante estimulação pelo DENV-2 (ultracentrifugado).**

As PBMCs de doadores saudáveis foram estimuladas por 18h com DENV-2 ultracentrifugado (UC). As células foram fenotipadas após análise em citometria de fluxo CD4, CD3, CD14, BDCA4, CD123 e TRAIL de superfície na região selecionada para "PDCs" CD14<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD123<sup>+</sup> BDCA4<sup>+</sup>. **(A)** Perfil de expressão de TRAIL membranar em populações de PDCs selecionadas de acordo com a figura 4.2.A e **(B)** porcentagem de PDCs TRAIL<sup>+</sup> (n=3) e estimulação de MOCK (UC) (laranja), DENV-2 (UC) (azul) ou sem estímulo (cinza). **(C)** Histogramas representativos da expressão de TRAIL em PDCs frente a estimulação com MOIs variados de DENV-2 (linhas azuis) (n=2). **(D)** PDCs positivas para TRAIL (n=4) e **(E)** produção de IFN- $\alpha$  em culturas estimuladas com DENV-2 (MOI 20), controles negativos ou PDCs pré-tratadas com cloroquina e estimuladas com DENV-2 (preto). Valores foram submetidos ao teste t pareado em que \* p < 0,05 e \*\* p < 0,005.

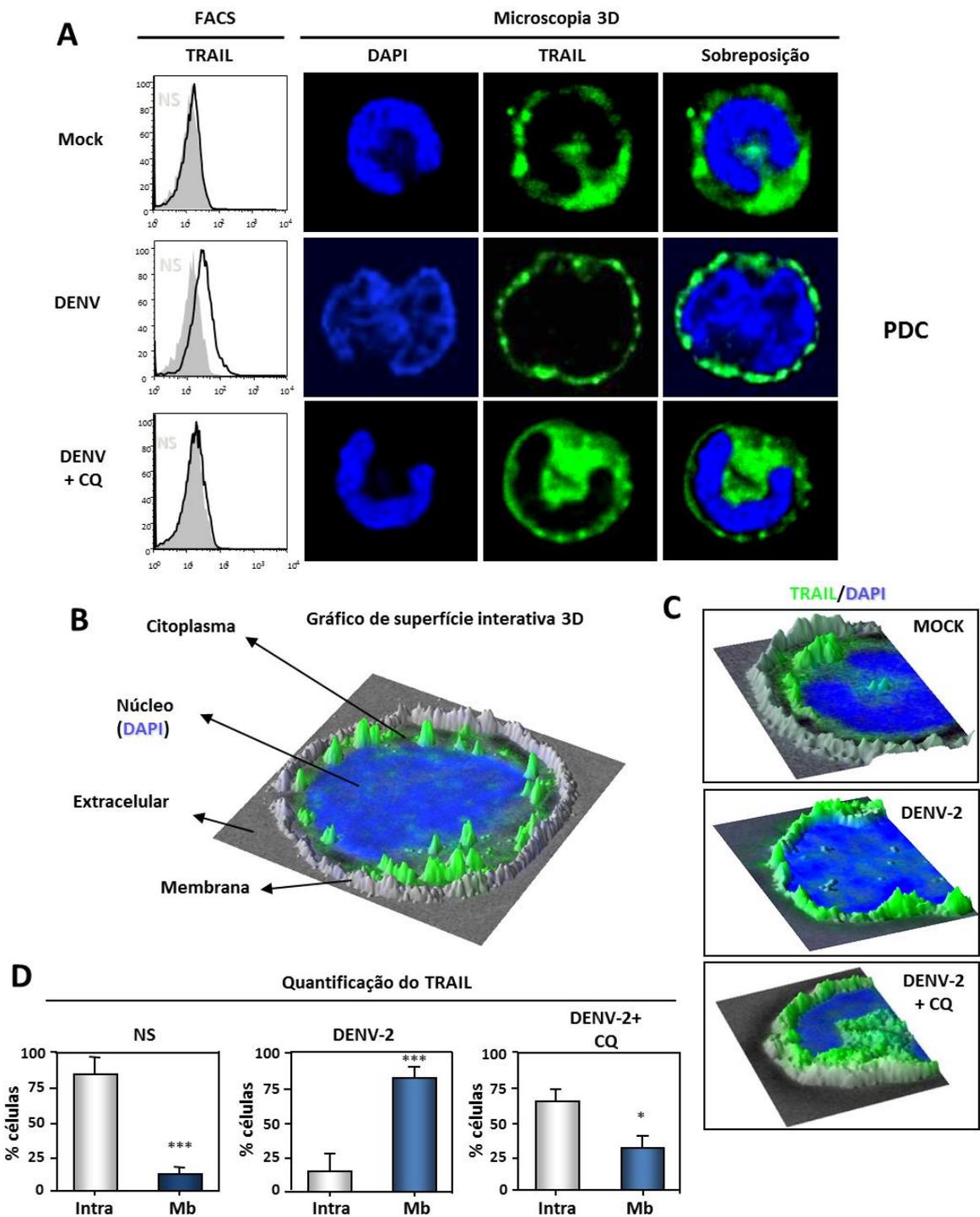
## 4.2.2 Localização de TRAIL e DENV-2 nas PDCs

Com intuito de melhor caracterizar as PDCs TRAIL<sup>+</sup> ativadas por DENV-2, observamos a expressão de TRAIL nas células por microscopia 3D confocal. A análise do plano focal revelou a detecção de TRAIL, porém aparentemente intracelular, em PDCs não estimuladas (Figura 4.5.A, linha superior), confirmando os dados obtidos por citometria de fluxo. As imagens das PDCs estimuladas com DENV-2 revelaram certa quantidade de TRAIL periférico que não pareceu estar localizada no citoplasma, mas sim na membrana plasmática (Figura 4.5.A, linha central). A detecção total da fluorescência da marcação com TRAIL em PDCs estimuladas com DENV-2 não foi tão diferente de células não estimulada. Entretanto, a distinção entre o perfil de expressão de TRAIL intracelular e superficial por esse método é difícil sem o uso de um marcador membranar. O bloqueio da acidificação endossomal pela cloroquina revelou o mesmo perfil expressão que as PDCs estimuladas com MOCK (Figura 4.5.A, linha inferior).

A reconstrução em 3D do plano focal (eixos XZ e YZ) das imagens obtidas foi realizada e permitiu identificar precisamente a localização de TRAIL no compartimento celular. O auxílio do plugin do programa ImageJ “3D interactive surface plot”, combinando as imagens de contraste de fase, permite a localização precisa do TRAIL: interna ou superficial (limitação da membrana). Um exemplo da imagem obtida nesse processamento está demonstrada na Figura 4.5.B, onde observa-se com a delimitação da membrana plasmática em cinza e o núcleo em azul. A marcação com anticorpos conjugados (em verde) pode ser então colocada em um desses compartimentos: membrana plasmática, núcleo e citoplasma.

A análise das PDCs estimuladas mostra que, nas células tratadas com MOCK, a maior parte da marcação para o TRAIL está no compartimento intracelular (Figura 4.5.C, painel superior). De todas as células analisadas nas diferentes imagens obtidas (n=3), 92% das células exibiram TRAIL intracelular quando comparada com as células que exibiram localização do TRAIL na membrana (11,5%,  $p=0,003$ ). Nas PDCs estimuladas com DENV-2, o TRAIL exibiu um perfil de colocação membranar, em que 89,6% das PDCs analisadas estavam na membrana enquanto 19% ( $p=0,0005$ ) tiveram localização apenas intracelular. O tratamento com cloroquina das PDCs estimuladas com DENV-2 (Figura 4.5.C, painel inferior) inibiu a maior parte (63,4% intracelular) da colocação do TRAIL com a

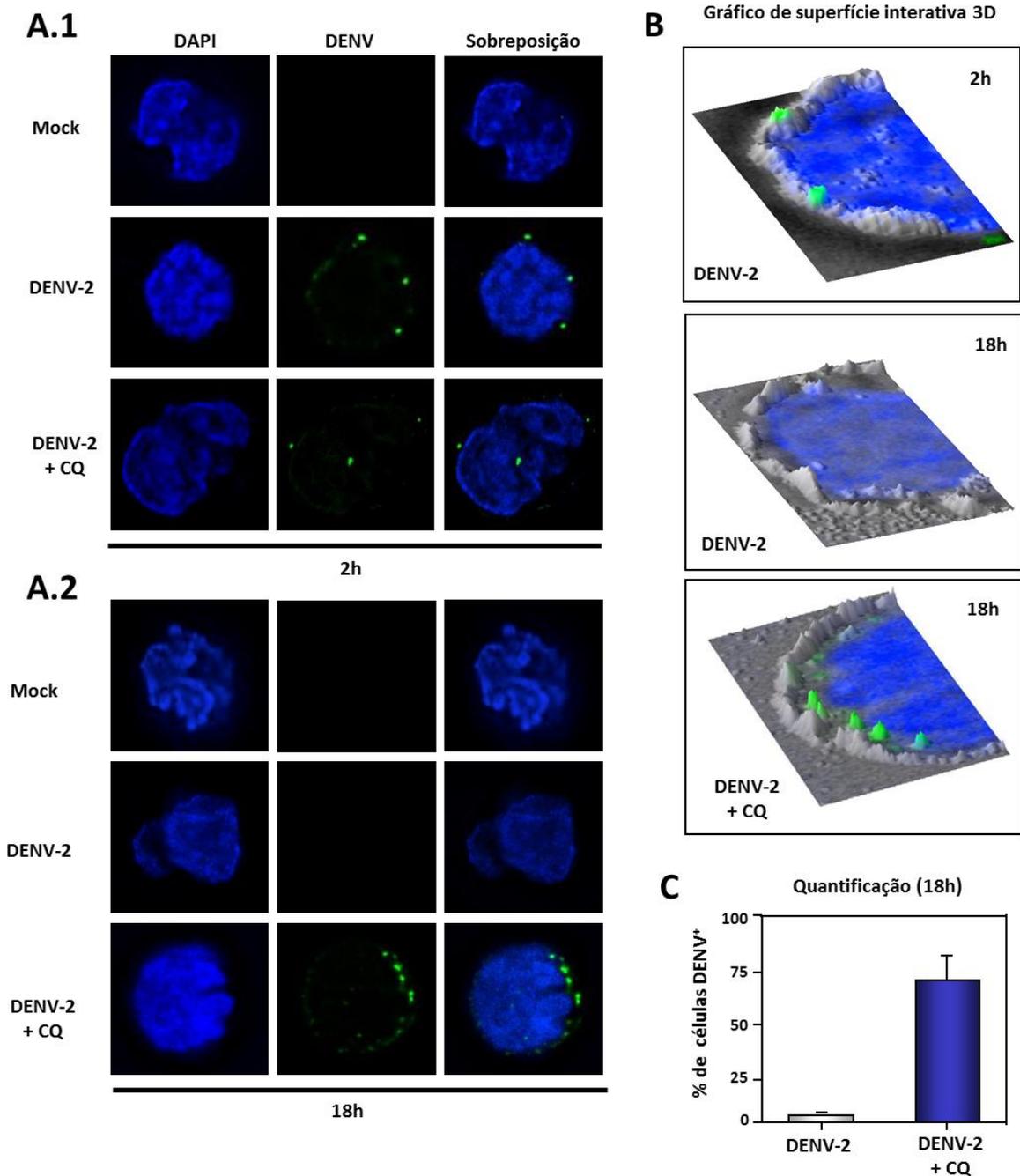
membrana plasmática das PDCs (36,7% membranas). A quantificação do TRAIL na membrana (Figura 4.5.D) demonstra um deslocamento do compartimento intracelular para a superfície quando as PDCs são estimuladas com DENV-2, e este evento está sendo bloqueado pela cloroquina.



**Figura 4.5: Localização do TRAIL em PDCs estimuladas por DENV-2 por análise microscopia 3D.**

As PDCs recém-purificadas foram pré-tratadas ou não com cloroquina (CQ) e estimuladas com DENV-2, ou tratadas com MOCK ou não tratadas (NS). A expressão de TRAIL foi analisada por citometria de fluxo ou por microscopia 3D. **(A-painel esquerdo)** Histogramas para TRAIL membranar em PDCs estimuladas com MOCK, DENV-2 ou pré-tratadas com cloroquina (linha preta) em sobreposição com TRAIL para PDCs não estimuladas (cinza). **(A-painel direito)** Imunofluorescência de PDCs tratadas (coluna A esquerda) com marcação nuclear com DAPI (azul) e anticorpos para TRAIL-Cy3 (verde). **(B)** Sobreposição 3D do núcleo (azul), TRAIL (verde) e contraste de fase (cinza) assim como observado em **(C)** para diferentes estímulos: PDCs estimuladas com DENV-2 exibem localização membranar do TRAIL em contraste com PDCs não estimuladas ou PDCs pré-tratadas com cloroquina (DENV-2+CQ) e estimuladas com DENV-2, onde o TRAIL é somente detectado intracelular. **(D)** Porcentagem de PDCs expressando TRAIL intracelular somente (Intra) ou na membrana (Mb). Valores foram submetidos ao teste t pareado em que \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ .

De modo a observar as partículas virais dentro das PDCs, a marcação para o antígeno viral também foi analisada por microscopia 3D. Uma vez que as partículas virais podem ser degradadas nos endossomos das PDCs pelas proteases ativadas em pH ácido (423), a localização das partículas virais foi observada também em cinética precoce de 2h de estimulação viral. As imagens do plano focal revelaram que a proteína do envelope do DENV foi detectada em proximidade com a membrana plasmática (Figura 4.6.A.1, painel central). Em contraste, as partículas virais parecem estar no compartimento intracelular PDCs tratadas com cloroquina (Figura 4.6.A.1, painel inferior). Entretanto, após 18h, a marcação para os antígenos virais foi somente detectada em PDCs tratadas com cloroquina (Figura 4.6.A.2, painel inferior). Assim, como descrito para a análise do TRAIL, uma análise 3D foi realizada e exhibe claramente a colocalização das partículas virais na membrana plasmática das PDCs após 2h de estimulação (Figura 4.6.B, painel superior). Não foram detectadas partículas virais no compartimento intracelular de PDCs após 2h ou 18h (Figura 4.6.B, painel central), sugerindo uma completa degradação viral nos lisossomos. Entretanto, as partículas virais foram detectadas no compartimento intracelular das PDCs que foram tratadas com cloroquina (Figura 4.6.B), sugerindo que a cloroquina estaria neutralizando o pH dos lisossomos, bloqueando as proteases ácidas e permitindo a detecção de antígenos virais na maior parte (70%) das PDCs (Figura 4.6.C). Desse modo, observamos que a relocalização de TRAIL foi observada quando nenhuma partícula viral foi detectada.



**Figura 4.6: Microscopia 3D das partículas de DENV-2 em PDCs.**

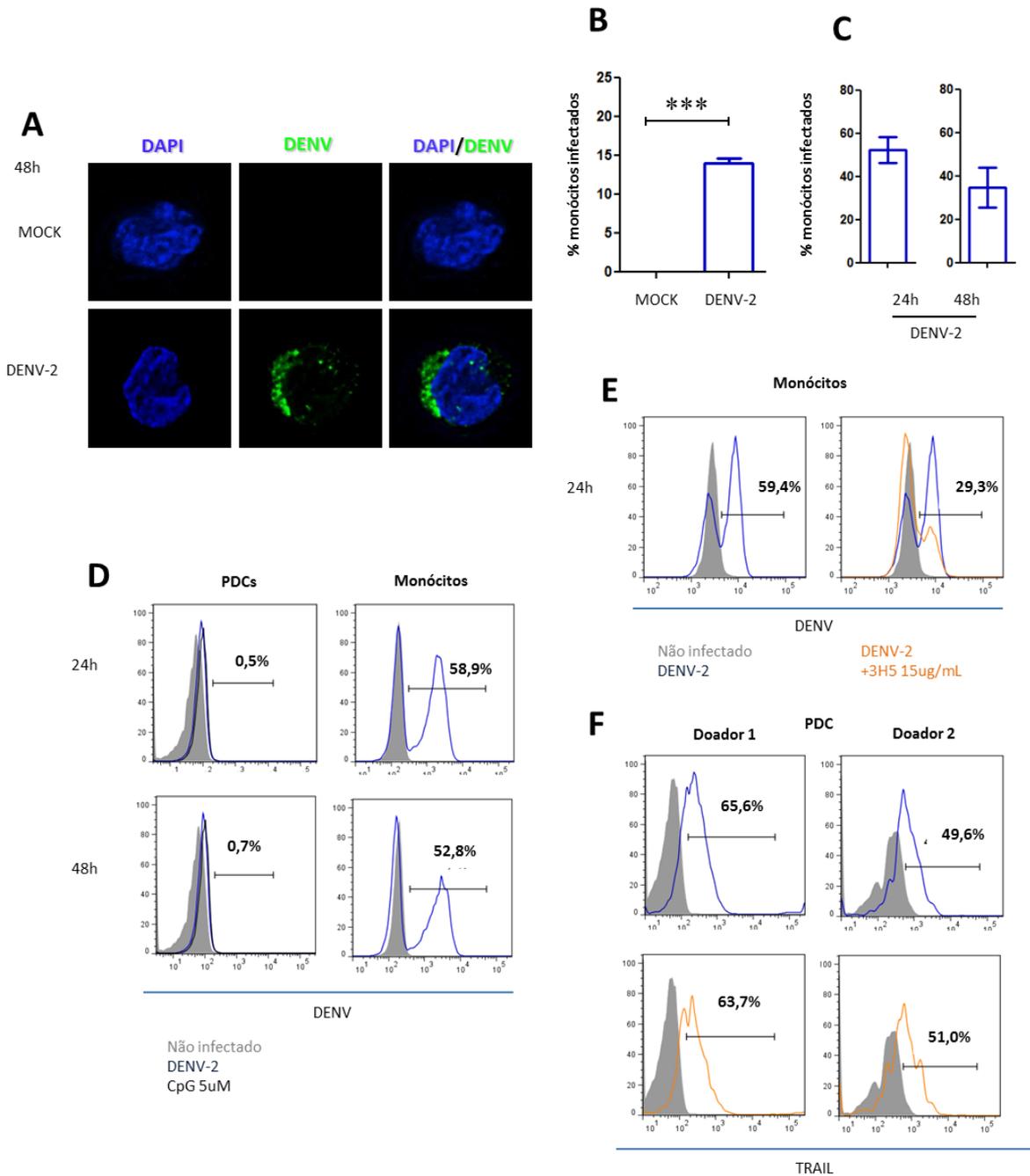
As PDCs recém-purificadas foram pré-tratadas ou não com cloroquina (CQ) e cultivadas com DENV-2, ou tratadas com MOCK e foram marcadas com anti-DENV-Cy3 (verde) e o núcleo corado com DAPI (azul). **(A)** Imagens de PDCs (núcleo, vírus, sobreposição) para MOCK, DENV-2, tratamento com cloroquina seguido de estimulação com DENV-2. A inibição da acidificação endossomal (cloroquina) permitiu uma melhor detecção de partículas de DENV (DENV-2+CQ em 2h e 18h de estimulação). Incubação por 2h de PDCs com DENV-2 **(A.1 – DENV-2)** foi suficiente para detecção de proteínas virais em contraste com a incubação por 18h das PDCs com vírus **(A.2 – DENV-2)** em que nenhum vírus foi detectado. **(B)** PDCs cultivadas com MOCK, DENV-2 e DENV-2+CQ foram analisadas em microscopia 3D e as imagens processadas exibidas em gráficos interativos de superfície 3D. Marcação de DENV (verde) foi sobreposta com as imagens do núcleo marcado com DAPI (azul) e do contraste de fase (cinza). As partículas virais foram co-localizadas com a membrana das PDCs após 2h de estimulação (painel superior). Cloroquina permitiu a detecção intracelular de DENV-2 em PDC após 18h (painel inferior) ao contrário da estimulação com DENV-2 somente (painel central). **(C)** Quantificação das PDCs expressando antígenos para DENV sem (DENV-2) ou com pré-tratamento com cloroquina (DENV-2+CQ) é mostrada como percentual do total de células analisadas.

### 4.2.3 Associação de antígenos virais com TRAILm em PDCs

De modo a investigar permissibilidade da replicação viral das PDCs ao DENV-2, foram realizadas comparações entre a detecção dos antígenos virais intracelulares em monócitos humanos, reconhecidamente permissivos a replicação viral, e as PDCs. Após 48h de incubação, observamos que os monócitos exibiram uma robusta detecção dos antígenos virais intracelulares por microscopia 2D, em que a fluorescência é detectada no citoplasma dos monócitos com ausência de marcação nuclear, o que é compatível com o ciclo replicativo dos flavivírus (Figura 4.7.A). Por esse método, 14,5% dos monócitos exibem robusta marcação para os antígenos virais em comparação ao MOCK somente (menor que 5%,  $p=0,0001$ , Figura 4.7.B). Por citometria de fluxo, observamos a marcação para o antígeno intracelular em 24h e 48h (Figura 4.7.C). Observa-se uma menor frequência de células positivas para os antígenos virais após 48h da cinética viral em monócitos (média  $\pm$  erro padrão:  $34,6 \pm 9,2\%$ ,  $n=5$ ), enquanto a maioria dos monócitos é infectada com 24h ( $52,5 \pm 5,9\%$ ,  $n=8$ ). As marcações de antígeno viral utilizando Mock foram sempre menores que 1,5%. Desse modo, observamos que a detecção por citometria de fluxo dos monócitos infectados por esse modelo foi eficaz em exibir a permissibilidade dessas células ao DENV-2. Assim, comparou-se a detecção de antígenos virais do DENV-2 em PDCs e em monócitos do mesmo doador ( $n=1$ ) em 24h e 48h. Para as PDCs foi utilizada também a estimulação com o oligonucleotídeo CpG como controle negativo da detecção do antígeno viral. Observamos (Figura 4.7.D) que, enquanto os monócitos exibem grande marcação de antígenos virais tanto em 24h (58,9%) quanto em 48h (52,8%), as PDCs exibiram marcação de menos de 1%. Esses dados sugerem que as PDCs não são permissivas à infecção viral pelo DENV-2.

Para observar se a exposição de TRAIL na superfície das PDCs estimuladas com DENV-2 seria influenciado por uma suposta replicação do DENV-2 nessas células, utilizou-se um anticorpo neutralizante contra DENV-2 (3H5) cedido pelo Dr. Philippe Despres do Instituto Pasteur (Paris, França). Esse anticorpo é específico para neutralização deste sorotipo e, por conseguinte, inibiria a exposição do domínio de fusão da proteína do envelope viral durante as alterações de pH nos endossomos. O teste de inibição da replicação em monócitos (Figura 4.7.E) demonstrou que 15  $\mu\text{g/mL}$  do anticorpo é capaz de bloquear aproximadamente 50% da replicação viral quando um MOI de 10 é utilizado. Utilizando o inóculo viral

adsorvido com 3H5 nas culturas de PDCs (Figura 4.7.F), observou-se que a detecção de PDCs TRAIL<sup>+</sup> não foi alterada (65,6% e 49,6%) pela neutralização viral (63,7% e 51%). Esses dados sugerem que a replicação viral em PDCs dificilmente ocorre e não seria grande influência sobre a expressão de TRAIL na membrana das PDCs.



**Figura 4.7: Testes de infecção e neutralização em PDCs e monócitos infectados com DENV-2.**

Os monócitos ou PDCs foram purificados e infectados com DENV-2 ultracentrifugado (MOI 10) por 24h ou 48h e marcados para antígeno viral intracelular e analisados por microscopia 2D (**A e B**) ou citometria de fluxo (**C-E**). Observa-se que a marcação do antígeno viral é específica para DENV, sendo detecta apenas antígenos nos monócitos infectados em localização perinuclear (**A**). Porcentagem de monócitos positivos para DENV contados nas imagens de imunofluorescência (**B**). (**C**) Monócitos positivos para DENV 24h (n=5) e 48h (n=8) em experimentos independentes. PDCs e monócitos foram estimulados com DENV-2 por 24h e 48h e as células foram fenotipadas e marcadas para o antígeno viral intracelular. (**D**) Histograma representando a marcação de DENV para PDCs (painel esquerdo) ou monócitos (painel direito) em 24h ou 48h após a adsorção viral. (**E**) Histogramas representando a detecção de DENV (4G2-Cy3) neutralizado ou não com anti-DENV2 3H5, 24h após a adsorção viral. (**F**) Histogramas representando a detecção de TRAIL em PDCs 24h após a estimulação com DENV-2 neutralizado (n=2). Para todos os gráficos: células não infectadas em cinza, células estimuladas com DENV-2 em azul, DENV-2 + anticorpo neutralizante 3H5 em laranja; e para (D) CpG 5uM em preto. Os valores foram submetidos ao teste t pareado em que \*\*\* p < 0,005.

## 4.3 Coculturas de PDCs com monócitos autólogos infectados

### 4.3.1 PDCs ativadas e influência na carga viral

Considerando-se que a carga viral é um fator importante para a gravidade da dengue (424), determinou-se a influência das PDCs durante a infecção viral *in vitro*. Como células alvo da replicação, utilizou-se o modelo de infecção de monócitos humanos que permitem replicação viral. O sistema de coculturas autólogas consistiu na interação entre PDCs ativadas *in vitro* que apresentaram o fenótipo de IKPDCs – expressando de TRAIL na membrana e produzindo de IFN $\alpha$  – e monócitos infectados pelo DENV-2.

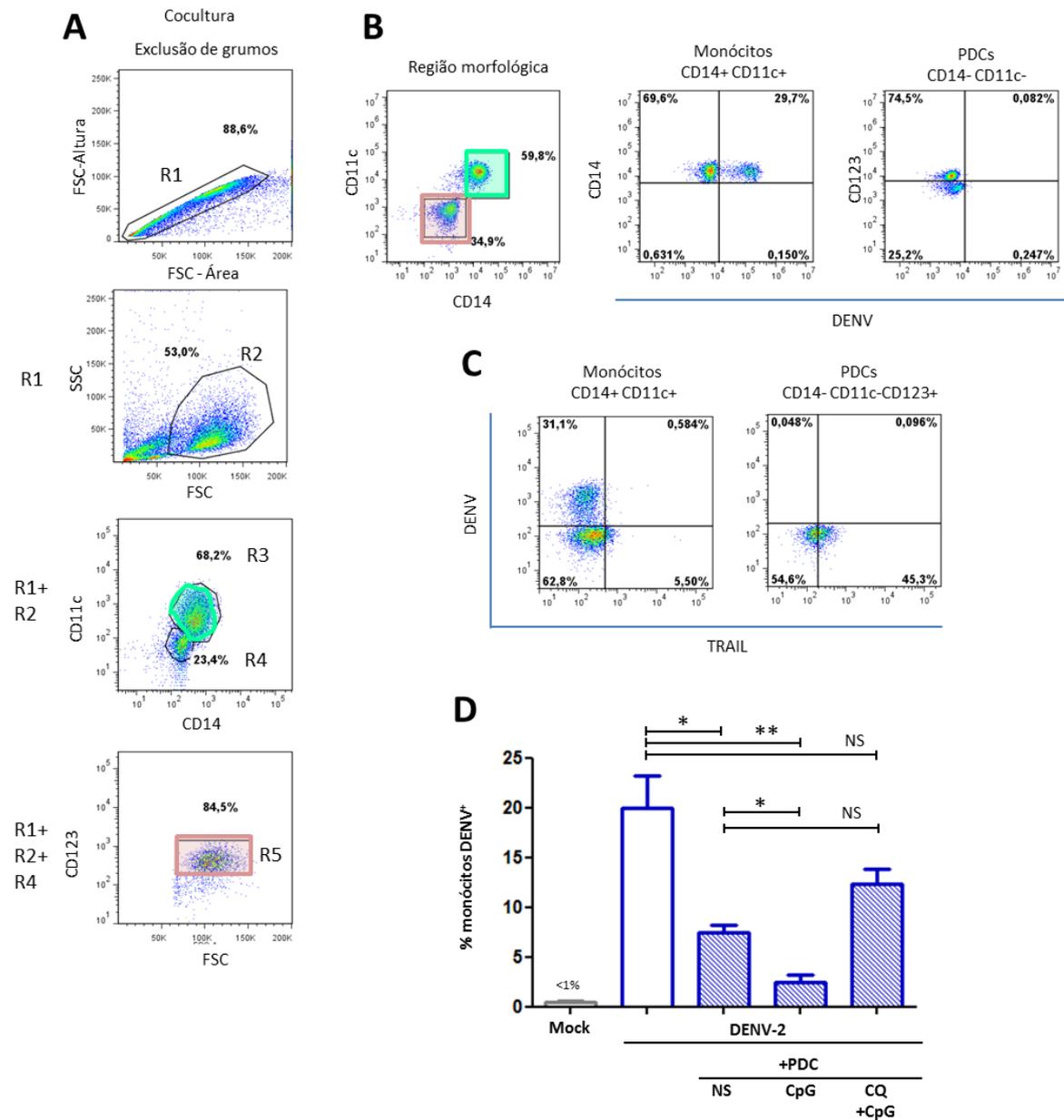
Para detectar a expressão de TRAIL na superfície e DENV intracelular, em monócitos e em PDCs, foi utilizada a estratégia de análise ([Figura 4.8.A](#)) que envolveu a expressão dos marcadores CD11c, CD123, CD14 nas populações estudadas. Primeiro, a detecção de grumos (ou doublets) foi excluída da análise usando os sinais obtidos dos canais FSC-A versus FSC-H. Os eventos que possuem mesmo valor de FSC-H, mas valores altos de FSC-A foram considerados grumos e excluídos da análise. Em seguida, foi realizada a delimitação da região morfológica e fenotípica das populações de monócitos e de PDCs. As populações CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> foram consideradas monócitos (R1+R2+R3) e as populações CD11c<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> (R1+R2+R4+R5) foram consideradas PDCs.

Observou-se primeiramente se as PDCs quando estimuladas com DENV (PDCs-DENV) poderiam exibir antígenos virais durante as coculturas, assim como os monócitos. Para essa análise, a estratégia de seleção das populações foi similar à citada anteriormente, porém as PDCs foram selecionadas apenas para CD11c<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>. Nesse sistema, não observamos antígenos virais dentro das PDCs estimuladas ([Figura 4.8.B](#)) e portanto, apenas os monócitos exibem antígenos virais intracelulares durante as coculturas.

Para obter IKPDCs utilizando uma estimulação não viral, utilizamos o CpG-A (PDCs-CpG), um oligonucleotídeo sintético agonista de TLR9 que é capaz de mimetizar a ativação das PDCs, induzindo a expressão de TRAIL e a produção de IFN $\alpha$  (275). Desse modo, evita-se uma possível interferência das partículas virais utilizadas para estimular as PDCs na infecção viral em monócitos. Assim, a detecção de antígenos virais nos monócitos é específica da adsorção viral nestas células.

Observamos que as PDCs-CpG não exibem positividade para o DENV (Figura 4.8.C, painel direito).

Quando analisada a expressão do antígeno viral nos monócitos em cocultura com as PDCs por 48 h (Figura 4.8.D), observamos a diminuição da detecção do antígeno viral nos monócitos quando nas coculturas com PDCs ativadas com CpG (PDCs-CpG) ( $2,5 \pm 0,7\%$ ;  $n=3$ ) em relação aos monócitos somente infectados ( $20 \pm 3\%$ ;  $p=0,004$ ). A cultura de PDCs não estimuladas (PDCs-NS) também foi capaz de diminuir a detecção do antígeno viral nos monócitos ( $7,4 \pm 0,7\%$ ;  $p=0,03$ ), porém em menor potencial que as PDCs-CpG ( $p=0,05$ ). O pré-tratamento com cloroquina nas PDCs estimuladas com CpG (PDCs-CQ+CpG) recuperou a detecção de antígenos virais nos monócitos ( $12,3 \pm 1,5\%$ ). Esses dados apontam que PDCs, principalmente quando estão ativadas, são capazes de reduzir a detecção de antígenos virais em monócitos infectados.



**Figura 4.8: Coculturas de PDCs e monócitos autólogos: estratégia de análise e detecção do antígeno viral.**

PDCs foram recém-purificadas, pré-tratadas ou não com cloroquina (CQ - 5 $\mu$ M) e estimuladas por 18h. Após a adsorção viral por 90min em monócitos, as culturas de PDCs foram adicionadas às culturas de monócitos (50.000 PDCs: 250.000 monócitos). Após 48h de interação, as células foram marcadas por citometria de fluxo para marcadores de fenotipagem e para o antígeno viral intracelular. **(A)** Estratégia de seleção para análise por citometria de fluxo de monócitos infectados e PDCs ativadas por CpG. O painel superior mostra a estratégia de exclusão de eventuais grumos e posterior seleção da região de monócitos (R1+R2+R3) e PDCs (R1+R2+R4+R5), com os anticorpos CD14-Pacific Blue, CD11c-PE.Cy7 e CD123-FITC. **(B)** “Dots plots” dos monócitos infectados com DENV-2 cultivados com PDCs-DENV. As células CD14<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup> (em rosa) quanto a expressão de CD123 e DENV (painel esquerdo) e as células CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (em verde) quanto a expressão de CD14 e DENV (painel central). Os dados exibidos em B e C são representativos de doadores diferentes. **(C)** “Dots plots” da marcação de DENV-ZenonAlexaFluor647 e TRAIL-PE nos monócitos e nas PDCs-CpG recuperados 48h após a interação. **(D)** Porcentagem de monócitos (n=2) infectados (DENV-2) ou tratados com MOCK 48h após interação com PDCs não estimuladas (+ PDC-NS), PDCs estimuladas com CpG (+PDC-CpG) ou pré-tratadas com cloroquina e estimuladas com CpG ODN 2216 5 $\mu$ M (+PDCs-CQ+CpG). Os valores foram submetidos ao teste t pareado em que \* p < 0,05; \*\* p < 0,005.

### 4.3.2 Efeito do TRAIL membranar das PDCs na detecção de antígenos virais nos monócitos

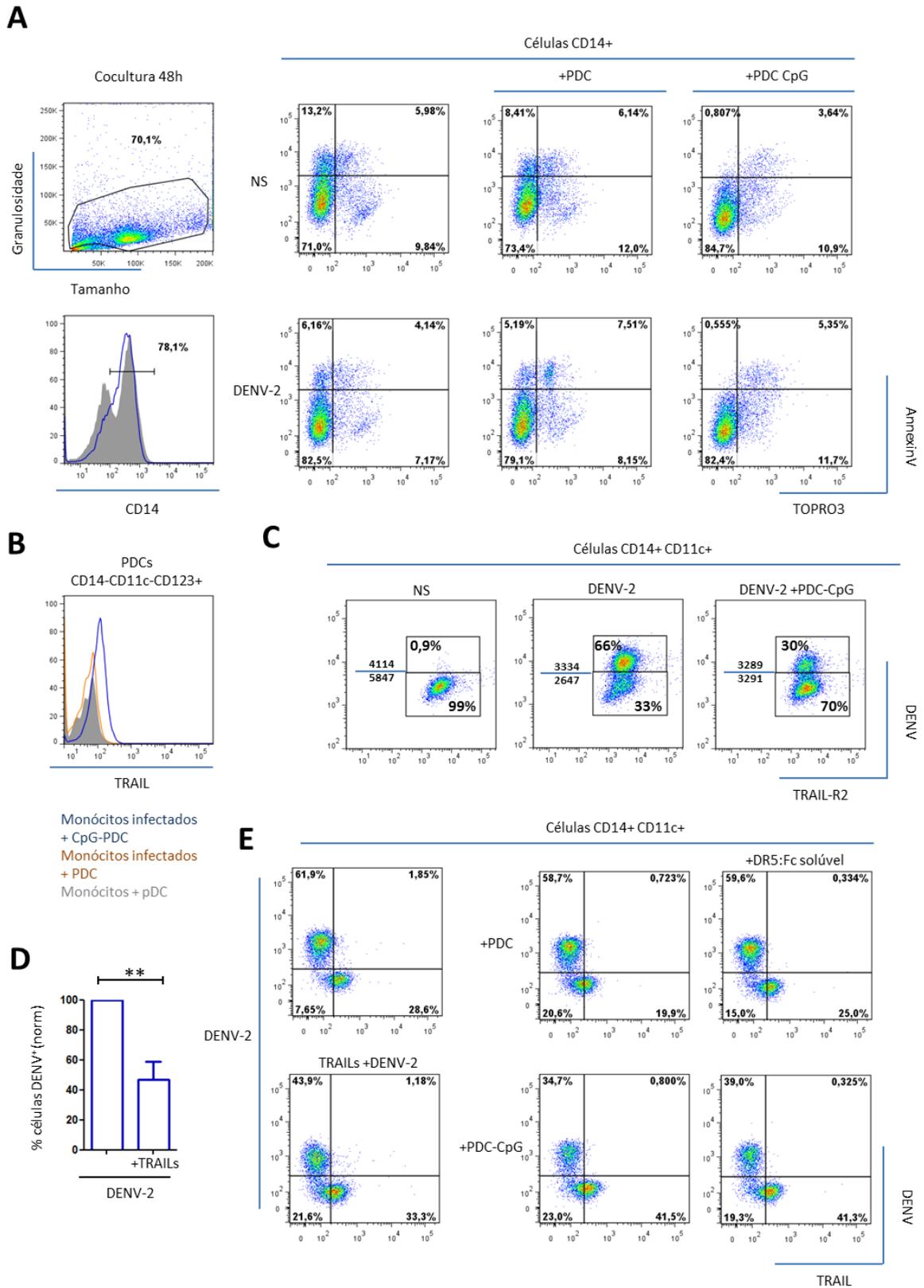
A molécula TRAIL é classicamente indutora de apoptose através da ligação aos seus receptores TRAIL-R1 e TRAIL-R2 (425). Por essa razão, investigou-se a possibilidade do mecanismo de ação antiviral das PDCs ativadas (ou IKPDCs) resultaria da indução da morte celular dos monócitos infectados. Observamos que a ausência de fosfatidilserina externalizada (marcada por anexina V) e o uso do corante vital TOPRO3 não apontaram o aumento da apoptose ( $n=2$ ) nas coculturas após 48h de interação (Figura 4.9.A). A expressão de TRAIL nas PDCs-CpG foi sustentada até mesmo depois 48h após o início das coculturas (Figura 4.9.B), excluindo a possibilidade de que a ausência do efeito apoptótico pelas PDCs estaria relacionada a ausência de TRAIL na superfície das PDCs. Observou-se também que as PDCs não estimuladas não expressam TRAIL, mesmo durante a cocultura com monócitos infectados, sugerindo que o efeito antiviral observado para PDCs-NS não estaria relacionado à expressão de TRAIL.

Uma vez que a transdução do sinal apoptótico pelo TRAIL necessita da ligação ao receptor TRAIL-R expresso nas células alvo, investigou-se a expressão do receptor de morte TRAIL-R2 nos monócitos durante a cocultura (após 24h de interação) e não foram encontradas diferenças na expressão de TRAIL-R2 entre os monócitos infectados e não infectados, adicionando ou não PDCs-CpG ( $n=1$ ) (Figura 4.9.C). Observou-se que o DENV-2 não foi capaz de modular a expressão de TRAIL-R2, de maneira significativa, nos monócitos infectados (média  $\pm$  erro padrão:  $1822 \pm 866$  MFI;  $n=3$ ) quando comparado aos monócitos não infectados ( $2368 \pm 1127$ ), embora tenha sido observada uma pequena redução na expressão 24h após a infecção.

Considerando que a redução da detecção do antígeno viral observada não foi em razão da função apoptótica do TRAIL nos monócitos infectados, estudou-se o papel antiviral do TRAIL solúvel nas culturas de monócitos humanos. O pré-tratamento dos monócitos com TRAIL (18h antes da infecção) reduziu a detecção de antígenos virais (24h após a infecção), sendo que 46,9% ( $\pm 7,7\%$ ,  $p=0,02$ ,  $n=3$ ) da cultura foi positiva para o antígeno viral, quando os valores foram normalizados com os obtidos para os monócitos somente infectados (Figura 4.9.D).

Para determinar se o TRAIL membranar nas PDCs teve envolvimento na diminuição de antígenos virais intracelulares nos monócitos, utilizamos anticorpos neutralizantes do TRAIL nas culturas de PDCs. Após a estimulação com CpG e antes de realizar as coculturas, as PDCs foram tratadas com DR5:Fc (TRAIL-R2) solúvel, que é capaz de bloquear o TRAIL na superfície das PDCs (n=1). Após 24h de interação, não foi observada diferença entre a detecção de antígenos virais nas coculturas de PDC-CpG com (PDCs-CpG-DR5) ou sem o tratamento com TRAIL-R2 (Figura 4.9.E). Também foram realizadas diversas tentativas em bloquear o TRAIL na membrana das PDCs usando anticorpo monoclonal neutralizante contra o TRAIL humano (n=3) em que não foram observadas diferenças pelo uso do monoclonal. Esses resultados mostram que no sistema *in vitro* estudado, não foi possível observar o efeito do TRAIL membranar das PDCs na redução da detecção de antígenos virais.

Figura 4.10



**Figura 9.9: Co-culturas de PDCs e monócitos autólogos: análise da função do TRAIL membranar em PDCs.**

As PDCs foram estimuladas com CpG ODN 2216 5µM por 18h, incubadas ou não com 10 µg/mL do receptor solúvel do TRAIL (DR5). Os monócitos foram tratados ou não com 25 µg/mL de TRAIL recombinante (TRAILs) por 18h, em seguida, adsorvidos com DENV-2 MOI10 por 90 min e cultivados com PDCs (50.000 PDCs: 200.000 monócitos). Após 24h ou 48h, as culturas foram fenotipadas (CD14, CD123, CD11c, TRAIL, TRAIL-R2) e marcadas intracelularmente para o antígeno viral ou para apoptose (Anexina V e TOPRO3). (A) Análise por

citometria de fluxo da apoptose em monócitos CD14<sup>+</sup> durante cocultura ou não, 48h após a interação (n=2). A coluna da esquerda mostra a estratégia de seleção de células CD14<sup>+</sup>, enquanto as colunas seguintes mostram gráficos de marcação de anexina-V versus TOPRO3 para as diversas condições estudadas. **(B)** Histograma representativo (n=3) da detecção superficial de TRAIL nas PDCs estimuladas com CpG e cultivadas com monócitos infectados por 48h (linha azul); ou não estimuladas e cultivadas com monócitos infectados (linha laranja), ou não estimuladas e cultivadas com monócitos não infectados (linha cinza). **(C)** Monócitos CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> não infectados (painel esquerdo), infectados por 24h (painel central), e infectados e cultivados com PDCs estimuladas com CpG (painel direito) com relação a expressão de TRAIL-R2 e DENV (4G2-PE). Valores de mediana de TRAIL-R2 são representados para cada uma das duas populações selecionadas no gráfico (n=1). **(D)** Monócitos positivos para DENV (n=3), 24h após a infecção, e pré-tratados ou não com TRAIL solúvel 18h antes da infecção. Valores normalizados em relação aos monócitos somente infectados. **(E)** "Dot plots" da marcação de DENV e TRAIL em monócitos infectados por 24h, cocultivados com PDCs ativadas por CpG com ou sem adição de DR5:Fc solúvel. Dados representam experimento para 1 doador. Valores foram submetidos ao teste t pareado em que \*\* p < 0,005.

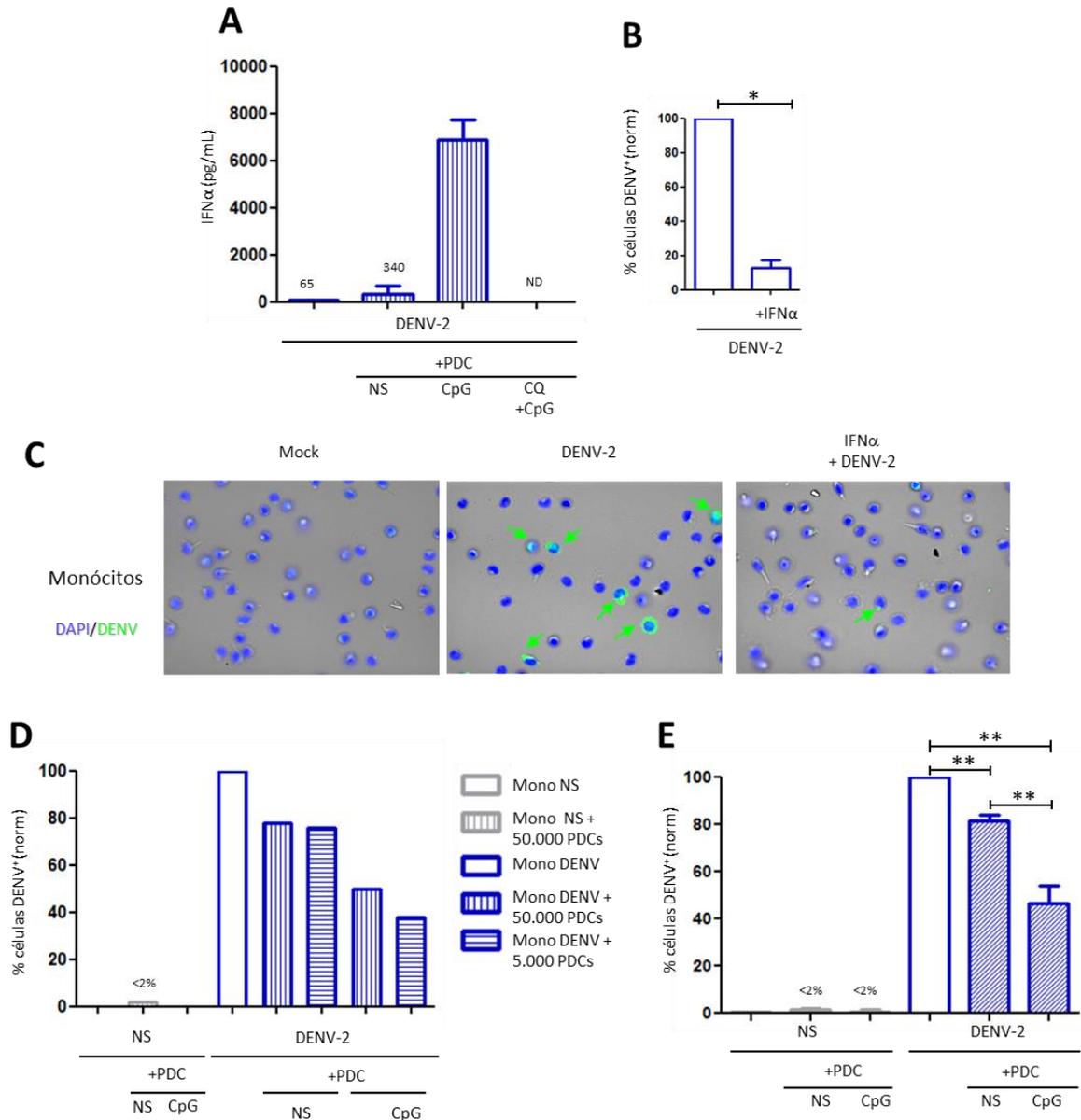
### 4.3.3 Efeito do IFN $\alpha$ na detecção dos antígenos virais intracelulares

As PDCs ativadas pelo DENV-2 produzem quantidades robustas de IFN $\alpha$ , assim como as PDCs estimuladas com CpG. Desse modo, foi investigado o papel do IFN $\alpha$  na replicação viral, durante as coculturas. A dosagem do IFN $\alpha$  (Figura 4.10.A) foi realizada por ELISA para os doadores da Figura 4.8.D. A citocina foi detectada em níveis elevados nas culturas dos monócitos infectados cultivados com PDCs-CpG (3889  $\pm$  835,8 pg/mL; n=2). Níveis muito baixos de IFN $\alpha$  foram detectados nas culturas de monócitos infectados (64,9  $\pm$  38,1 pg/mL), mesmo quando PDCs-NS (340,3 pg/mL) são adicionadas. A cloroquina foi capaz de bloquear completamente a produção de IFN $\alpha$  nas culturas (valores menores que o limite de detecção).

O IFN $\alpha$  induz um estado antiviral nas células que bloqueia a replicação viral. De fato, o tratamento dos monócitos por 18h com IFN $\alpha$  recombinante (Figura 4.10.B) reduziu significativamente a detecção de antígenos virais 48h após a infecção (12,6  $\pm$  4,5 % normalizado em relação ao valor total dos antígenos virais detectados na condição monócitos somente infectados para cada doador; n=5). Nas imagens de imunofluorescência, observa-se além da redução dos antígenos viral, uma morfologia alterada das culturas tratadas com o recombinante (Figura 4.10.C, painel esquerdo).

Diferentes números de PDCs foram cultivadas com os monócitos infectados, objetivando estudar o efeito do TRAIL na superfície das PDCs no efeito antiviral observado nos monócitos infectados (Figura 4.10.D). Os valores foram normalizados utilizando a condição monócitos somente infectados como 100% de células DENV+ e o valor 0%, como ele próprio. Observa-se que a adição de 50.000 ou 5.000 PDCs-NS foi capaz de reduzir 22% ou 25%, respectivamente, a detecção de antígenos virais (n=1). As PDCs-CpG em qualquer uma das razões PDCs:monócitos testadas foram capazes de reduzir a detecção dos antígenos virais (50% e 62%,

respectivamente). Esses dados sugerem que os fatores solúveis produzidos pelas PDCs, e não moléculas de membrana, seriam responsáveis pela diminuição da infecção nos monócitos. O efeito antiviral também foi observado quando o antígeno viral nos monócitos em cocultura foi detectado 24h após a interação, com menor número de PDCs (25.000) e maior número de monócitos (225.000). Nessas condições, observamos uma redução significativa na detecção de antígenos virais (Figura 4.10.E) nas culturas com PDCs-CpG (média normalizada  $\pm$  erro padrão:  $46,3 \pm 7,5\%$ ;  $n=4$ ;  $p=0,006$ ). Uma pequena redução na detecção de antígenos virais foi observada para as PDCs-NS quando comparada ao controle positivo ( $81,4 \pm 2,5\%$ ;  $p=0,009$ ) e às PDCs-CpG ( $p=0,005$ ). Esses dados suportam a função de fatores solúveis produzidos pelas PDCs na diminuição da detecção dos antígenos virais, uma vez que mesmo alterando as taxas PDCs:monócitos, a inibição da replicação viral foi em média 50% (50% - 62% - 53%) para os diferentes números de PDCs cultivados (5.000 – 50.000 – 25.000).



**Figura 4.10: Coculturas PDCs e monócitos autólogos: análise do IFN- $\alpha$  solúvel e do número de PDCs cultivadas.**

As PDCs foram estimuladas com CpG ODN 2216 5 $\mu$ M por 18h. Os monócitos foram tratados ou não com 100UI/mL de IFN $\alpha$  recombinante pelo mesmo período. Após a adsorção viral, os monócitos foram cultivados com as PDCs, estimuladas ou não. Após 24h ou 48h as culturas foram imunofenotipadas (CD14, CD123, CD11c, TRAIL) e marcadas intracelularmente para o antígeno viral. O sobrenadante foi dosado por ELISA para IFN $\alpha$ . **(A)** Níveis de IFN $\alpha$  (n=2) após 48h de interação entre monócitos infectados e PDCs (250.000/50.000 células) estimuladas com CpG (PDC-CpG), ou pré-tratadas com cloroquina e estimuladas com CpG (CQ+CpG), ou não estimuladas (NS). **(B)** Monócitos CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> positivos para o DENV, pré-tratados ou não com 100IU/mL de IFN $\alpha$  (n=5), 48h após a adsorção viral. Dados foram normalizados de acordo com a porcentagem de antígeno viral em monócitos somente infectados. **(C)** Imagens de microscopia da sobreposição das imagens de detecção por anticorpos do antígeno viral intracelular (verde), do núcleo corado com DAPI (azul) e do contraste de fase (cinza). As setas verdes apontam células positivas para o antígeno viral, em que se observa a diminuição da detecção de células DENV<sup>+</sup>, 48h após a infecção, quando os monócitos são pré-tratados com IFN $\alpha$  recombinante. **(D e E)** Porcentagem de antígeno viral, normalizado em relação a detecção de DENV em monócitos somente infectados. **(D)** Gráfico da detecção (48h) de monócitos DENV<sup>+</sup> (200.000) em cocultura com 5.000 (azul listrado horizontal) ou 50.000 (azul listrado vertical) PDCs ativadas ou não com CpG (n=1). **(E)** Coculturas de 225.000 monócitos infectados (azul) ou não (cinza) e cultivados com 25.000 PDCs (azul listrado oblíquo crescente) ativadas ou não 24h após a infecção (n=4). Valores não normalizados foram submetidos ao teste t pareado em que \* p < 0,05 e \*\* p < 0,005.

#### 4.3.4 Associação entre IFN $\alpha$ e TRAIL e a detecção do antígeno viral intracelular

Os efeitos do IFN $\alpha$  liberado pelas PDCs ativadas agindo na infecção viral foram estudados. Abordamos um protocolo de inibição da ligação da citocina ao seu receptor na membrana das células alvo da infecção, ou a ligação de IFN $\alpha$  ao IFNAR. Para isso primeiramente tentou-se neutralizar a citocina solúvel adicionando-se anticorpos neutralizantes anti-IFN $\alpha$  na presença de PDCs antes da montagem das coculturas. Entretanto, os resultados mostram a ineficiência do bloqueio utilizado em reduzir a detecção de antígenos virais: para valores de detecção do antígeno viral normalizados e igual a 100%, observou-se em 24h que a adição de PDCs-CpG reduziu para  $50,9 \pm 3,3\%$  ( $n=3$ ) a detecção dos antígenos virais e o tratamento com os anticorpos neutralizantes exibiu  $47,4 \pm 7,3\%$ . Na cinética de 48h, o mesmo resultado foi observado:  $50,0 \pm 6,3\%$  e  $59,0 \pm 5,1\%$  de detecção de antígenos virais (normalizado) para PDCs-CpG e PDCs-CpG com a adição do anticorpo neutralizante, respectivamente (dados não mostrados).

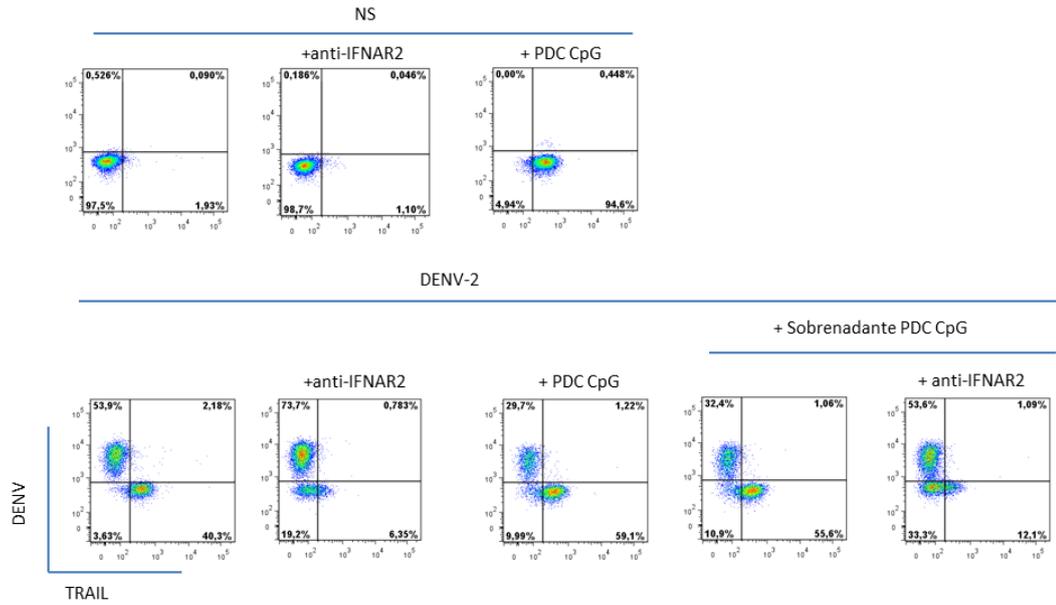
Uma segunda abordagem foi a utilização de apenas o sobrenadante das culturas de PDCs estimuladas com CpG para tratamento dos monócitos após a adsorção viral. Desse modo, foi possível estudar diretamente os efeitos dos fatores solúveis na infecção viral (Figura 4.11.B). Observamos que esse sobrenadante (SBN-PDCs-CpG) foi capaz de mimetizar (média  $\pm$  erro padrão:  $58,6 \pm 1,5\%$ ,  $n=2$ ) a inibição da detecção de antígenos virais observada para as coculturas com PDCs-CpG ( $57,5 \pm 2,4\%$ ), 24 h após a adsorção viral. Em seguida, uma vez que a inibição da citocina solúvel não foi efetiva, foi realizado o bloqueio do seu receptor nas células alvo. A adição de anticorpos neutralizantes para a subunidade IFNAR2 do receptor dos IFNs do tipo I logo após o fim da adsorção viral foi a abordagem escolhida para verificar a detecção de antígenos virais (Figura 4.11.C). Observamos que os monócitos infectados e tratados com o anticorpo anti-IFNAR2 exibem tendenciosamente maior detecção de antígenos virais (média normalizada:  $128,4 \pm 22,9\%$ ,  $n=5$ ) quando comparado aos monócitos somente infectados. Entretanto, o bloqueio de IFNAR durante as coculturas (Figura 4.11.B) foi mais efetivo em recuperar a detecção de antígenos virais. Os monócitos infectados com IFNAR bloqueado exibiram recuperação para  $77 \pm 0,5\%$  de antígenos virais quando cultivados com PDCs-CpG, que foi maior quando SBN-PDCs-CpG ( $87,0 \pm 12,5\%$ ) foi

utilizado. Esses resultados indicam um possível papel dos IFN do tipo I produzido pelas PDCs na redução da replicação viral.

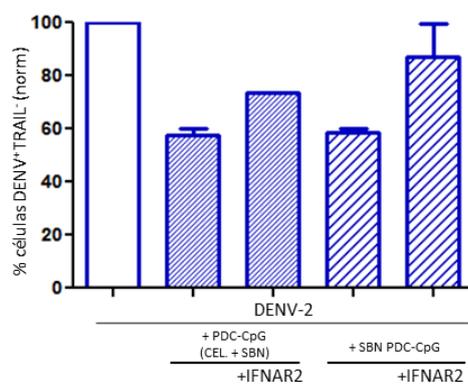
Apesar de não termos encontrado um papel efetivo do TRAIL da superfície das PDCs na redução da replicação viral, observamos que os monócitos em cocultura ou possuem em geral menos de 3% de células TRAIL<sup>+</sup>DENV<sup>+</sup> ([Figura 4.11.A](#)). Desse modo, estudamos a associação entre o IFN $\alpha$  produzido nas coculturas, a exposição de TRAIL na membrana das células alvo e as taxas de células infectadas. Assim, observamos ([Figura 4.11.D](#)) primeiramente que os monócitos não infectados quando em cocultura com PDCs-CpG exibem um grande número de células DENV-TRAIL<sup>+</sup> sugerindo que fatores solúveis produzidos pelas PDCs ativadas estão envolvidos na expressão de TRAIL na superfície dos monócitos, 24h após a cocultura. Entretanto, observamos que parte dos monócitos somente infectados exibem células 32,2  $\pm$  8,7% DENV<sup>+</sup>TRAIL<sup>+</sup>, em valores significativamente maiores que monócitos não infectados (média  $\pm$  erro padrão: 4,3  $\pm$  0,4%; n=5;  $p=0,04$ ), visto que este fator solúvel também é produzido pela infecção (64,9  $\pm$  38,1 pg/mL; [Figura 4.10.A](#)). Assim, testamos o envolvimento desta citocina na expressão de TRAILm nos monócitos. De fato, durante as coculturas ([Figura 4.11.D](#)) com SBN-PDCs-CpG (55,2  $\pm$  1%) ou PDCs-CpG (46,1  $\pm$  10,7%) observamos maior porcentagem de monócitos DENV<sup>+</sup>TRAIL<sup>+</sup> quando comparado às porcentagens dos monócitos somente infectados (24,1  $\pm$  12%). Esses dados sugerem o envolvimento entre a expressão de TRAILm nos monócitos e a inibição da infecção viral. De fato, ao inibirmos a ligação da citocina IFN $\alpha$  ao seu receptor nos monócitos (bloqueio do IFNAR), observamos uma queda significativa na expressão de TRAILm na condição monócitos somente infectados ([Figura 4.11.E](#); 4,2  $\pm$  1,4%,  $p=0,02$ ). O mesmo fenômeno é observado durante as coculturas com SBN-PDCs-CpG+IFNAR (10  $\pm$  2%) ou PDCs-CpG+IFNAR (8,9  $\pm$  0,5%). A inibição da expressão do TRAIL pode ser observada nos perfis de análise de citometria de fluxo representados na [Figura 4.11.A](#). Quando IFN $\alpha$  recombinante (150ng/mL) é administrado aos monócitos não infectados (dados não mostrados), ocorre uma robusta expressão de TRAIL (média  $\pm$  erro padrão: 87,8  $\pm$  0,3 %, n=2) em contraste aos monócitos não tratados (1,8  $\pm$  0,1 %). Uma correlação inversa e significativa foi calculada entre a expressão de TRAIL e a detecção dos antígenos virais nos monócitos infectados durante as coculturas (Spearman  $r=-0,56$ ;  $p=0,02$ ). Esses dados apontam que ambos TRAIL e IFN $\alpha$  seriam antivirais para o DENV.

**A**

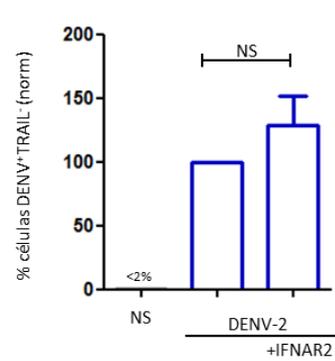
Monócitos CD14<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>



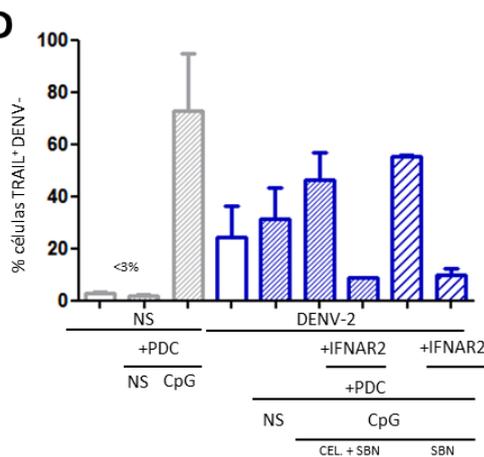
**B**



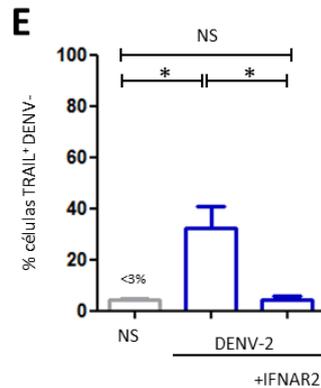
**C**



**D**



**E**



**Figura 4.11: Coculturas PDCs e monócitos autólogos: relação IFN $\alpha$  e TRAIL na superfície dos monócitos.**

As PDCs (25.000 células) foram estimuladas com CpG ODN 2216 5 $\mu$ M por 18h. Os monócitos (225.000 células) foram purificados e plaqueados pelo mesmo período. Após a adsorção viral, os monócitos foram tratados com 1 $\mu$ g/mL de anticorpo anti-IFNAR2 e em seguida, cultivados com sobrenadante (SBN) ou com a cultura de PDCs estimuladas (Cél.+SBN). Após 24h, foi realizada a marcação para CD14, CD123, CD11c, TRAIL na superfície e antígeno viral intracelular. **(A)** Perfil de marcação de DENV versus TRAIL por análise em citometria de fluxo de monócitos CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> durante cocultura com PDCs ou seu sobrenadante de cultura; tratados com anti-IFNAR2, representativo para um doador. **(A-D)** As barras em cinza representam monócitos não infectados e as barras azuis representam os monócitos infectados. O preenchimento das barras indica a cocultura com 25.000

PDCs (azul listrado oblíquo) ou com o sobrenadante de cultura de PDCs-CpG (azul listrado oblíquo espaçado) ou o cultivo de monócitos somente (branco). **(B)** Porcentagem de monócitos DENV<sup>+</sup>TRAIL<sup>-</sup> durante as coculturas com PDCs ou seu sobrenadante (valores normalizados em relação aos valores dos monócitos somente infectados) (n=2). **(C)** Porcentagem de monócitos DENV<sup>+</sup>TRAIL<sup>-</sup> e tratados com anticorpo anti-IFNAR2 (valores normalizados em relação aos valores dos monócitos somente infectados) (n=5). **(D)** Porcentagem de monócitos DENV-TRAIL<sup>+</sup> durante as coculturas com PDCs ou seu sobrenadante (n=2). **(E)** Porcentagem de monócitos DENV-TRAIL<sup>+</sup> e tratados com anticorpo anti-IFNAR2 (n=5). Os valores não normalizados foram submetidos ao teste t pareado em que \* p < 0,05.

Sumarizando os resultados do estudo das PDCs:

Observou-se na infecção natural pelo DENV que não há alterações expressivas na frequência de PDCs no sangue periférico, porém uma maior frequência de PDCs TRAIL<sup>+</sup> é encontrado nos pacientes, principalmente nos casos mais brandos. Dois fatores solúveis resultantes da ativação das PDCs, IFN $\alpha$  e TRAIL, foram encontrados em níveis mais elevados nos casos mais brandos e correlações positivas foram obtidas.

Os dados *in vitro* indicam que as PDCs humanas são ativadas pelo DENV-2, uma vez que são TRAIL<sup>+</sup> e produzem IFN $\alpha$ . A ativação é dependente da via endossomal, dose viral dependente e infecção independente. As PDCs ativadas diminuíram a detecção de antígenos virais em monócitos infectados, em ambos os pontos estudados (24 e 48h) e para todas as razões PDCs:monócitos estudadas. A função apoptótica do TRAIL da membrana das PDCs não foi observada. O DENV2 não foi capaz de alterar a expressão de TRAIL-R2 nos monócitos infectados (24h). Entretanto, o pré-tratamento com TRAIL foi capaz de inibir a replicação viral nos monócitos.

O IFN $\alpha$  recombinante também foi capaz de bloquear a replicação viral nos monócitos, assim como os sobrenadantes de cultura de PDCs ativadas. O bloqueio do receptor IFNAR propiciou um aumento na detecção de antígenos virais nos monócitos durante a cocultura. Além disso, o bloqueio deste receptor também recuperou a detecção de antígenos virais nos monócitos tratados com o sobrenadante de cultura das PDCs ativadas. O IFN $\alpha$  recombinante, assim como o sobrenadante de PDCs ativadas foi capaz de induzir a expressão de TRAIL membranar nos monócitos humanos, infectado ou não.

Não foram observados monócitos positivos para DENV e para TRAIL concomitantemente. Houve uma correlação inversa entre a expressão de TRAIL nos monócitos e a detecção de antígenos virais.

## 4.4 Células NK durante a infecção natural pelo DENV

As células NK fazem parte da imunidade inata e são efetoras antivirais através da citotoxicidade frente a células infectadas e também através da produção de citocinas. As frequências e os marcadores de ativação dessas células estão alterados durante a fase aguda da dengue (106). Desse modo, primeiramente avaliamos as diferentes subpopulações das células NK durante a infecção natural pelo DENV em pacientes durante a fase aguda da doença. As células do grupo de pacientes estudados no item 4.1 (tabela 4.1) foram fenotipadas para as subpopulações de CD56 e CD16, sem o uso do marcador CD3 (Figura 4.12.A e B). Por esse método de análise observamos duas subpopulações de células NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (Figura 4.12.A) e CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (Figura 4.12.B). Observamos que ambas as populações estão aumentadas durante a fase aguda da doença nos casos de FDSA (mediana 8,4% e 9,5%, respectivamente n=25) em relação aos controles saudáveis (5,0% e 7,0%;  $p=0,01$  e  $p=0,02$ ; n=18) e aos casos de Dengue Grave (4,8% e 4,3%;  $p=0,04$  e  $p=0,002$ ; n=8). Apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa, os casos de FDCA apresentaram valores intermediários (5,7% e 9,4%) em relação aos valores para os casos de FDSA e Dengue Grave. Esses resultados estão em concordância com dados anteriores do nosso grupo em que observamos aumento significativo de células NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> em pacientes com a forma branda da doença (106).

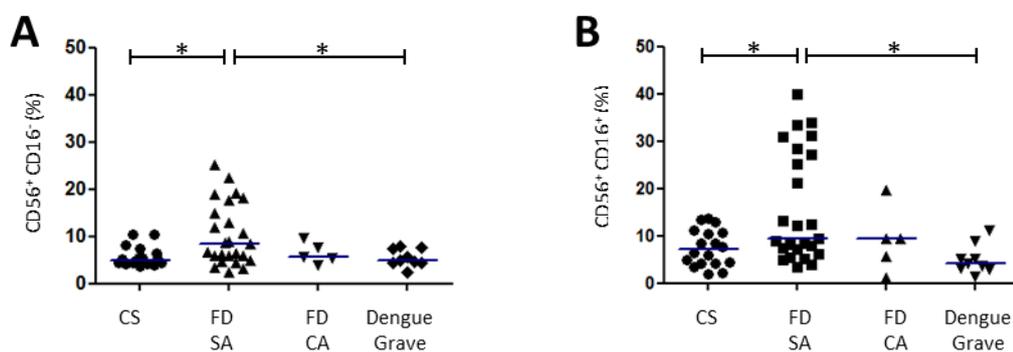


Figura 4.12: Frequência de células Natural Killer durante a fase aguda da dengue.

As PBMCs de pacientes de fase aguda foram analisadas por citometria de fluxo. (A e B) Análise da população de células NK selecionada em PBMCs totais como CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (A) e CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (B), sem o uso do marcador CD3. Cada ponto representa um indivíduo e valores de medianas são exibidos como linhas azuis. Valores foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney em que \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.005$  e \*\*\*  $p<0.0005$

Uma análise mais detalhada do processo de ativação das células NK envolveu o uso de um grupo menor de pacientes obtidos na mesma epidemia da análise dos pacientes no item 4.2. As características demográficas desse novo agrupamento encontram-se na Tabela 4.2 e são similares às da Tabela 4.1. Os pacientes foram divididos em 3 grupos para melhor distribuição dos números de casos por classificação.

**Tabela 4.2: Informações demográficas sobre o estudo de células NK em pacientes infectados com dengue**

| <b>Características</b>  | <b>FDSA<sup>2</sup></b> | <b>(N)</b> | <b>FDCA<sup>2</sup></b> | <b>(N)<sup>3</sup></b> | <b>Dengue Grave<sup>2</sup></b> | <b>(N)<sup>3</sup></b> |
|---|-------------------------|------------|-------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|
| <b>Idade (mediana, 25-75%)</b>  | 46,31-57                | (11)       | 35,27-43                | (8)                    | 27,15-43                        | (4)                    |
| <b>Sexo (M:F; número de pacientes)</b>  | 7:4                     |            | 2:6                     |                        | 4:0                             |                        |
| <b>Febre</b>  | 100%                    | (10)       | 100%                    | (8)                    | 100%                            | (4)                    |
| <b>Hospitalização</b>   | 0%                      | (9)        | 75%                     | (8)                    | 75%                             | (4)                    |
| <b>Manifestações hemorrágicas (mucosa)<sup>4</sup></b>                        | 0%                      | (10)       | 50%                     | (8)                    | 75%                             | (4)                    |
| <b>Vômitos constantes</b>   | 0%                      | (9)        | 0%                      | (4)                    | 33%                             | (3)                    |
| <b>Dor abdominal persistente</b>  | 0%                      | (9)        | 25%                     | (4)                    | 66%                             | (3)                    |
| <b>Hipotensão<sup>5</sup></b>   | 0%                      | (9)        | 0%                      | (6)                    | 33%                             | (3)                    |
| <b>Derrames<sup>6</sup></b>   | 0%                      | (9)        | 0%                      | (6)                    | 66%                             | (3)                    |
| <b>Contagem de plaquetas (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)<sup>7</sup></b>     | 142±25                  | (10)       | 75±26                   | (7)                    | 46±26                           | (4)                    |
| <b>Trombocitopenia (&lt;50x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>                | 10%                     | (10)       | 43%                     | (7)                    | 66%                             | (4)                    |
| <b>Hematócrito</b>  | 41±1%                   | (10)       | 43±2%                   | (7)                    | 43±2%                           | (4)                    |
| <b>Hemoconcentração<sup>8</sup></b>   | 40%                     | (10)       | 50%                     | (6)                    | 50%                             | (4)                    |
| <b>Dengue anterior (IgG positivo)</b>   | 82%                     | (11)       | 100%                    | (7)                    | 66%                             | (3)                    |
| <b>Aumento rápido no hematócrito concomitante a queda brusca de plaquetas</b> | 0%                      | (10)       | 28%                     | (7)                    | 50%                             | (4)                    |
| <b>Contagem de leucócitos (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)<sup>7</sup></b>    | 4350±795                | (10)       | 2838±295                | (6)                    | 2983±560                        | (4)                    |
| <b>ALT (U)<sup>7</sup></b>  | 89±23                   | (9)        | 136±37                  | (6)                    | 260±204                         | (8)                    |
| <b>AST (U)<sup>7</sup></b>  | 98±30                   | (9)        | 130±40                  | (6)                    | 308±241                         | (9)                    |

<sup>1</sup> População de estudo com 43 pacientes.

<sup>2</sup> FDSA (Febre do dengue sem sinais de alerta) e FDCA (Febre do dengue com sinais de alerta; Dengue grave de acordo com OMS (421)

<sup>3</sup> Número de pacientes com informação disponível durante a hospitalização

<sup>4</sup> Manifestações hemorrágicas (epistaxe, gengivorragia, metrorragia, tosse com catarro sanguinolento).

<sup>5</sup> Hipotensão postural com queda na pressão arterial sistólica em 20mmHg na posição supino ou pressão arterial sistólica menor que 90mmHg.

<sup>6</sup> Derrame pleural ou pericárdico ou ascite

<sup>7</sup> Média ± erro padrão do número mínimo de plaquetas e leucócitos registrados e do valor máximo de hematócrito ou ALT/AST.

<sup>8</sup> Hematócrito elevado (20% durante o curso da doença ou maior que 45% para homens ou maior que 41% para mulheres)

De modo a analisar os marcadores de ativação somente nas células NK, utilizou-se o marcador CD3 na análise, que é expresso em outras células CD56<sup>+</sup> excluindo a contaminação de células NK T ou CD8. Assim, a estratégia de seleção das células NK é descrita na [Figura 4.13.A](#), em que após seleção na região morfológica de linfócitos, as células CD3 foram excluídas da análise e as células CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> foram selecionadas. Em razão da menor quantidade de células de pacientes, não foi possível analisar as células CD3-CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> nesses grupos.

Não observamos dessa vez nenhuma diferença estatística entre os pacientes analisados da frequência das células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (CS mediana 34%; FDSA 16,7%; FDCA 18,65%; e Dengue Grave 32,55%).

As células NK ativadas tornam-se potencialmente citotóxicas e podem eliminar as células alvo por indução de apoptose. Nesse caso, estudamos a presença de dois marcadores de superfície de células NK que refletiriam a sua capacidade citotóxica. A função do TRAIL na membrana das células NK seria similar às IKPDCs, onde a ligação TRAIL:TRAIL-R induziria a apoptose. O marcador CD107a é uma molécula associada aos grânulos citolíticos que permanece na membrana plasmática extracelularmente após a exocitose, sendo então, reflexo da citotoxicidade dessas células (426).

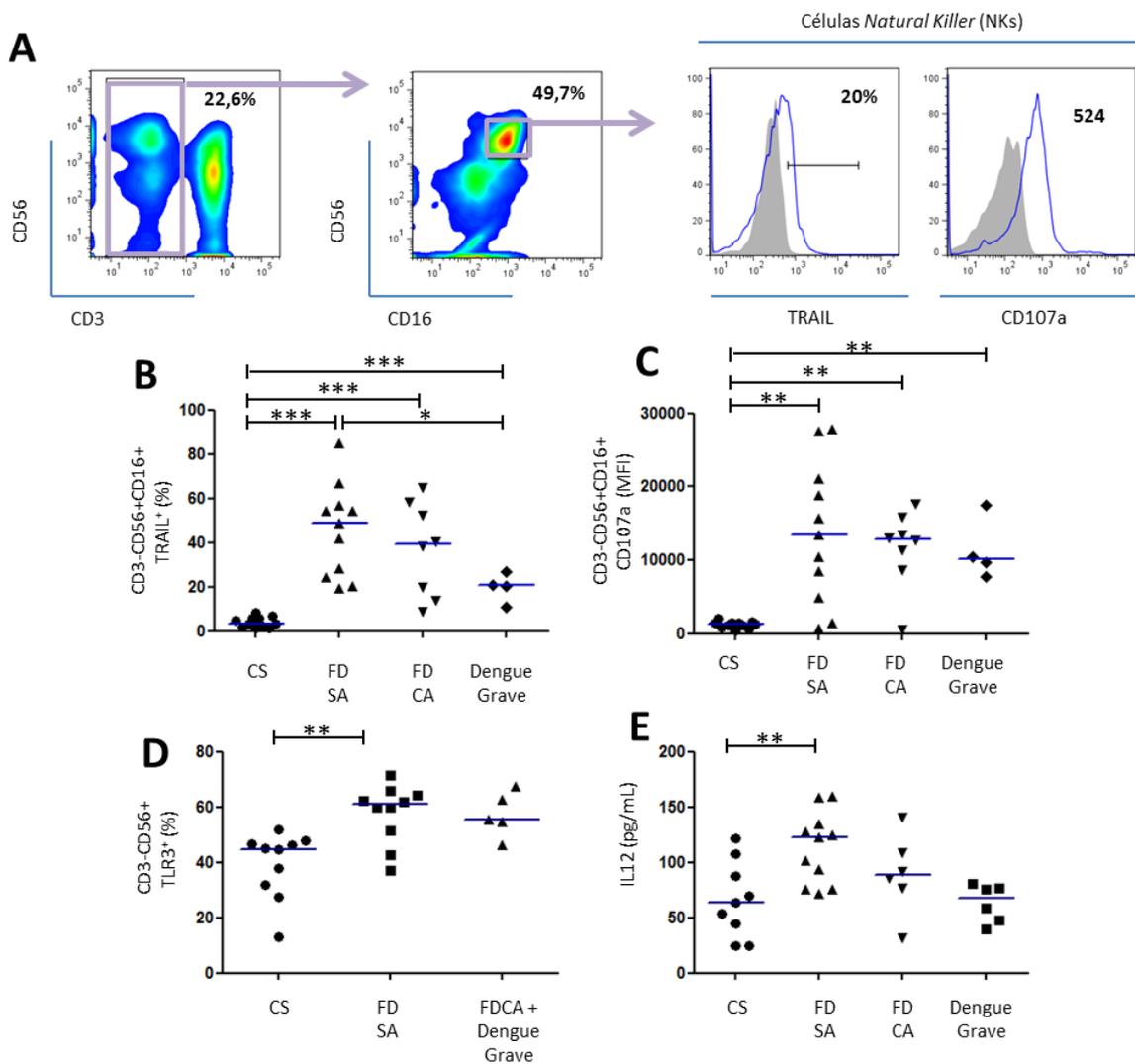
A expressão de TRAIL nas células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (Figura 4.13.B) foi analisada e observamos uma maior positividade nas células dos pacientes com FDSA (mediana 48,65%, n=12) em comparação aos controles saudáveis (3,18%; n=11;  $p=0,0001$ ) e aos casos de Dengue Grave (20,6%; n=4;  $p=0,05$ ). Apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa, os casos de FDCA apresentaram valores intermediários (39,4%; n=8) em relação aos valores para os casos de FDSA e Dengue Grave, sugerindo uma associação da expressão de TRAIL com os quadros clínicos da doença. Todos os grupos apresentaram um maior número de células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>TRAIL<sup>+</sup> em relação aos controles saudáveis ( $p<0,0005$ ).

As células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> dos pacientes também exibiram maiores médias de intensidade de fluorescência (MIF) de CD107a (FDSA – 13400, n=11; FDCA – 12850, n=8; Dengue Grave – 10081, n=4) em comparação aos controles saudáveis (CS – 1256, n=11), porém não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes estudados (Figura 4.13.C). Alguns pacientes (n=15) tiveram tanto as PDCs quanto as células NK analisadas e foi possível observar uma correlação positiva entre a porcentagem de TRAIL na membrana das PDCs e a intensidade de fluorescência de CD107a na membrana das células NK (Spearman  $r=0,50$ ;  $p=0,05$ ), sugerindo uma cooperação entre esses dois tipos celulares durante as infecções.

Analisamos também a presença de TLR3 intracelular nas populações CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>. A expressão de TLR3 é observada em células NK ativadas e sua regulação colabora para o reconhecimento de produtos da infecção viral. Observou-se que esse marcador (Figura 4.13.D) estava aumentado significativamente nos casos de

FDSA (mediana 61,0%, n=10) em relação aos controles saudáveis (44,7%, n=10;  $p=0,005$ ). Devido ao reduzido número de pacientes analisados nos grupos FDCA e Dengue Grave (55,5%, n=5,  $p=0,005$ ), estes foram agrupados e não encontramos diferenças estatísticas entre eles com relação aos FDSA, mas sim com relação aos controles saudáveis.

Observamos também a dosagem de fatores solúveis relacionados com a ativação de células NK. Como já foi descrito na seção 4.1, o IFN $\alpha$  foi encontrado em maior quantidade nos casos mais brandos (FDSA) de dengue. Assim, analisamos outras duas citocinas correlacionadas com o aumento da citotoxicidade dessa população celular: a IL15 e a IL12. Não encontramos diferenças significantes nos níveis de IL15 entre os grupos de pacientes estudados (mediana CS – 10,71 pg/mL, n=8; FDSA – 13,13 pg/mL, n=12; FDCA – 10,88 pg/mL, n=4; Dengue Grave – 13,59 pg/mL, n=5). Entretanto, a análise dos níveis de IL12 ([Figura 4.13.E](#)) revela maiores níveis da citocina nos pacientes mais brandos (mediana 122,2 pg/mL) em relação aos controles saudáveis (63,80 pg/mL,  $p=0,006$ ) e também aos casos mais graves (67,3 pg/mL,  $p=0,01$ ). Ainda, foi possível observar uma forte correlação positiva entre os níveis de IL12 e TRAIL solúvel nos pacientes (Spearman  $r=0,74$   $p=0,04$ ), corroborando o envolvimento de ambas citocinas nos casos mais brandos da doença.



**Figura 4.13:** Perfil de ativação de células *Natural Killer* e detecção de IL12 em pacientes com febre do dengue.

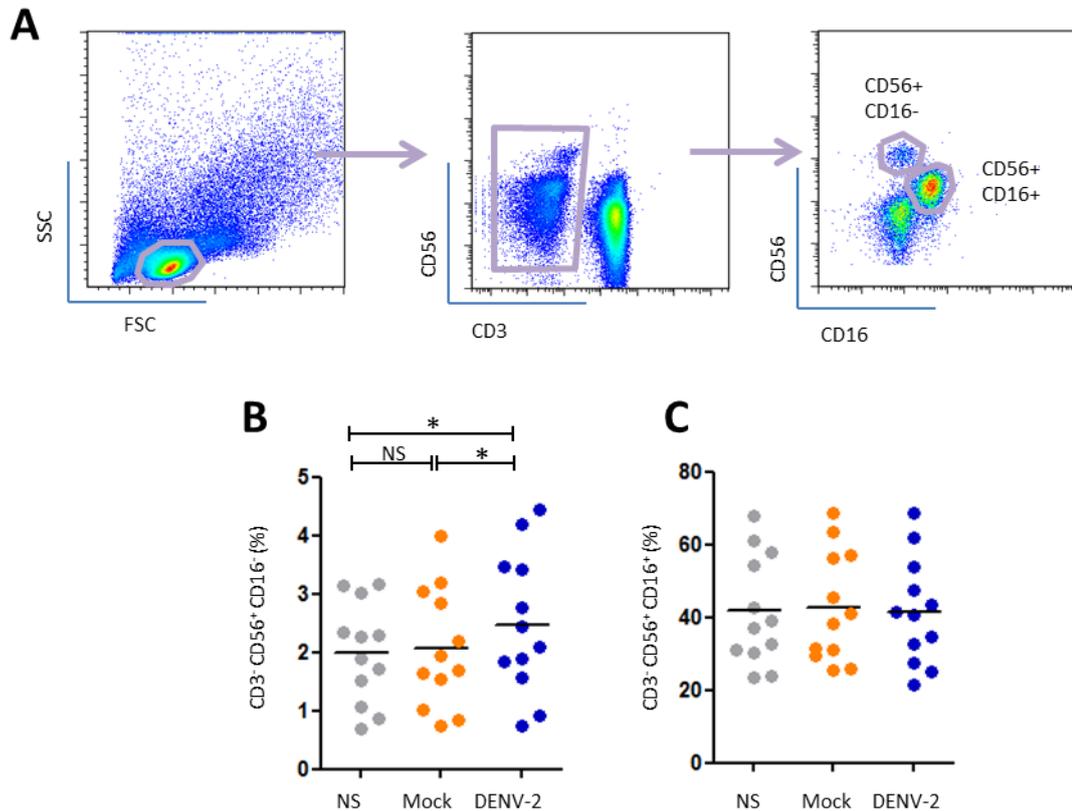
As PBMCs e plasma de pacientes de fase aguda foram analisados por citometria de fluxo e ELISA, respectivamente. **(A)** Estratégia de seleção de células NK por exclusão de células CD3+ e seleção de CD56+CD16+ para análise de TRAIL, CD107a e TLR3. **(B)** Células NK CD3-CD56+CD16+ e TRAIL+ ou sua expressão da mediana de intensidade de fluorescência de CD107a **(C)** foram analisadas nos seguintes grupos: controles saudáveis (CS), pacientes com FD (FDSA), pacientes com FD com sinais de alerta (FDCA) e Dengue Grave. **(D)** Células NK totais (CD3-CD56+) positivas para TLR3 intracelular nos seguintes grupos: controles saudáveis (CS), pacientes com FD (FDSA), pacientes com FD com sinais de alerta (FDCA) somado aos pacientes com Dengue Grave. **(E)** Dosagem de IL12 do plasma de fase aguda dos pacientes. Cada ponto representa um indivíduo e valores de medianas são exibidos como linhas azuis. Valores foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney em que \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$  e \*\*\*  $p < 0.0005$ .

Observou-se, assim, uma maior ativação das células NK dos casos mais brandos do dengue em relação aos fatores membranares - TRAIL e CD107a, intracelulares (TLR3) e aos solúveis relacionados - IFN $\alpha$  e IL12.

## 4.5 Células NK durante estimulação *in vitro* com DENV

### 4.5.1 Efeito da estimulação viral na alteração de frequência das células NK

Para observar os efeitos da estimulação viral em células NK *in vitro* foi utilizado o mesmo sistema descrito para estimulação de PDCs em PBMCs humanas. Assim, PBMCs foram estimuladas com DENV em diversos MOIs e após 18h de estimulação a frequência de células NK foi observada. A estratégia de seleção das populações foi feita de acordo com a estratégia utilizada nas amostras de células de pacientes. As células CD3<sup>+</sup> foram excluídas e as populações CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> e CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> foram estudadas (Figura 4.14.A). Observamos que as PBMCs que foram estimuladas com DENV MOI10 (Figura 4.14.B e C), exibiram maior frequência de células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> ( $2,8 \pm 0,3\%$ , n=12), quando comparado a PBMCs estimuladas com MOCK ( $2,1 \pm 0,3\%$ ,  $p=0,01$ ) ou não estimuladas ( $1,9 \pm 0,2\%$ ,  $p=0,01$ ). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre as frequências de células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> para todos os estímulos estudados (NS –  $41,8 \pm 4,3\%$ ; MOCK –  $42,8 \pm 4,4\%$ ; DENV-2 –  $41,5 \pm 4,0\%$ ). Assim, observamos somente a alteração de frequência significativa na subpopulação de células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> induzidas pelo DENV2 no modelo *in vitro*.



**Figura 4.14: Frequência de células NK em PBMCs estimuladas com DENV-2 *in vitro***

As PBMCs de doadores saudáveis foram estimuladas por 18h com DENV-2 MOI 10 (azul) e Mock (laranja) ou não estimuladas (cinza). As células NK foram analisadas por citometria de fluxo após imunomarcagem para CD3, CD56, CD16 e TRAIL e analisadas. **(A)** Estratégia de seleção de células NK CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup>. Porcentagem de células NK CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> **(B)** e CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> **(C)** de PBMCs de 12 doadores estimuladas por DENV-2 MOI 10, Mock ou não estimuladas. Dados foram analisados por teste estatístico t Student em que \*  $p < 0.05$ ;

#### 4.5.2 Expressão de marcadores de ativação nas células NK *in vitro*

Os marcadores de citotoxicidade de células NK foram avaliados nas suas duas subpopulações durante a estimulação com DENV-2. Primeiramente observamos a expressão de TRAIL na superfície das células NK (**Figura 4.15.A**) após 18h de estímulo. As células CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> que tiveram suas frequências aumentadas após estimulação pelo DENV, também passam a expressar uma robusta quantidade de TRAIL na superfície celular (**Figura 4.15.B**, média  $\pm$  erro padrão  $78,4 \pm 7,7\%$ ,  $n=12$ ) em comparação ao estímulo com Mock ( $3,9 \pm 0,9\%$ ,  $p=0,0001$ ) ou nenhum estímulo ( $2,0 \pm 0,4\%$ ,  $p=0,0001$ ). A subpopulação CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> também exibiu o TRAIL na membrana de forma significativa quando estimulada pelo DENV-2 ( $37,3 \pm 6,8\%$ ,  $n=12$ ) quando comparado ao MOCK ( $2,6 \pm 0,9\%$ ,  $p=0,0001$ ) ou à condição sem estímulo ( $1,7 \pm 0,4\%$ ,  $p=0,0001$ ). Observamos também que, a população CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> exibiu maior expressão de TRAIL

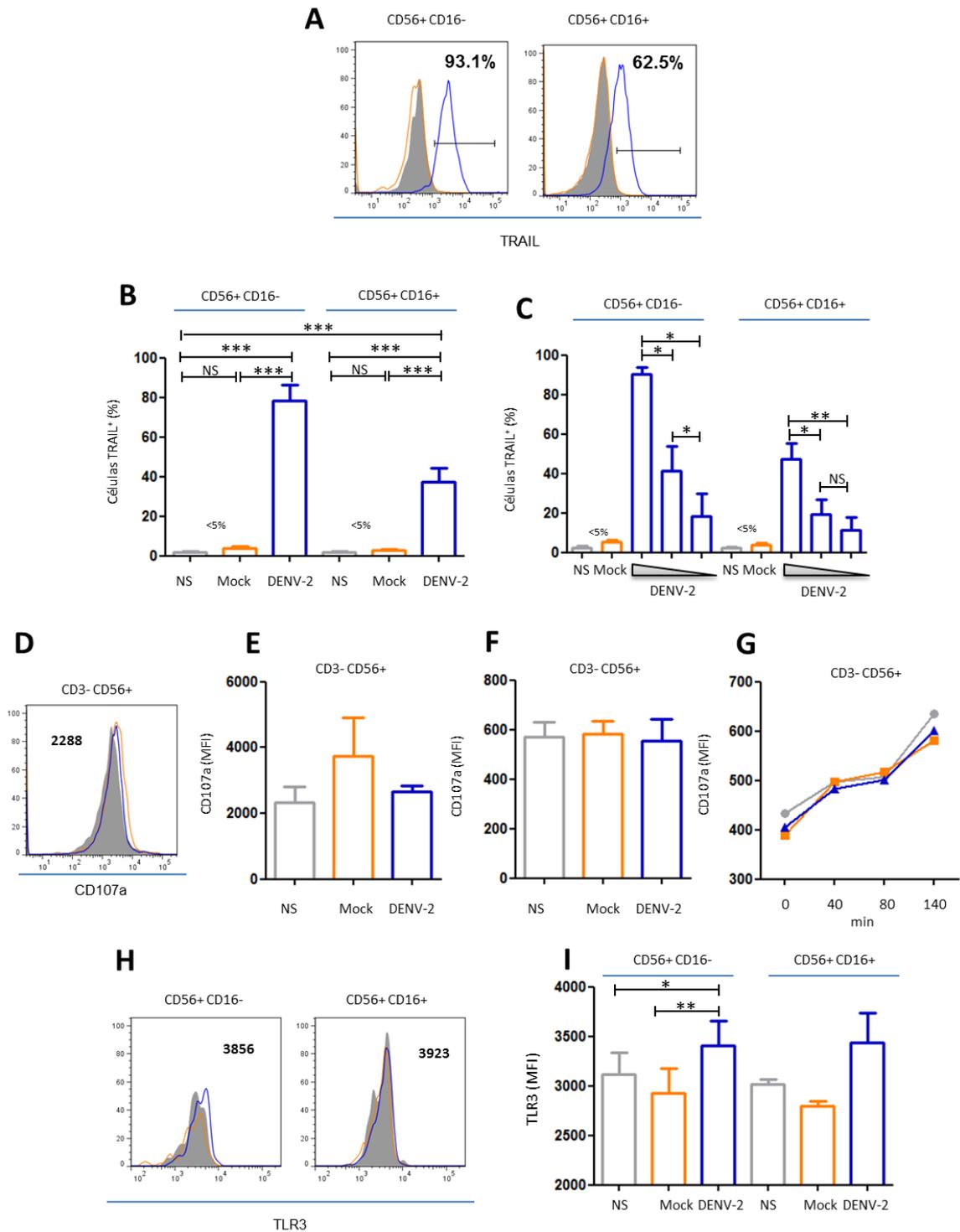
membranar que a população CD3-CD56+CD16+ ( $p=0,0001$ ). Assim, o DENV-2 teve efeito biológico positivo nas duas populações estudadas com relação à expressão de TRAIL.

Também se observou a influência da carga viral na expressão de TRAIL nas células NK (Figura 4.15.C). Foram detectadas diferenças significativas entre as estimulações com DENV-2 MOI 10 e MOI 1 tanto para a população CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> ( $90,1 \pm 3,5\%$  versus  $41,3 \pm 12,7\%$ ;  $n=8$ ;  $p=0,01$ ), quanto para CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ( $47,3 \pm 8,0\%$  versus  $19,2 \pm 7,5\%$ ,  $n=8$ ;  $p=0,02$ ). No caso da utilização de MOI 0,1 não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação às células não estimuladas tanto para CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (MOI 0,1 –  $18,1 \pm 11,2\%$ ) quanto para CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (MOI 0,1 –  $11,1 \pm 6,4\%$ ). Utilizando MOI 1, apenas as células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> exibiram uma diferença significativa ( $41,2 \pm 12,7\%$ ,  $p=0,02$ ) em relação a ausência de estímulo, enquanto que a subpopulação CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> apresentou apenas uma tendência ao aumento do TRAIL ( $19,2 \pm 7,5\%$ ,  $p=0,058$ ). Assim sendo, a expressão de TRAIL nas duas subpopulações de células NK foi dose dependente.

Considerando que as culturas de PBMCs também contêm as células alvo para a replicação do DENV (monócitos), é possível que as células NK tornem-se citotóxicas e induzam a morte das células em cultura. Assim, investigada a expressão de CD107a nas células NK totais (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) nas culturas após 18h (Figura 4.15.D). Não observamos diferença significativa na expressão de CD107a (Figura 4.15.E) quando Mock (média  $\pm$  erro padrão:  $3744 \pm 1159$ ;  $n=3$ ) ou DENV-2 MOI 10 ( $2658 \pm 197$  MFI) são utilizados como estímulo em relação às células não estimuladas ( $2324 \pm 491$  MFI). Após a degranulação, o CD107a é exposto na membrana, mas pode cair na rede de reciclagem endossomal e deixar de ser expresso extracelularmente. Por esse motivo, foi utilizada a brefeldina que interfere no tráfego endossomal e bloqueia o retorno do CD107a para os lisossomos. Entretanto, após 6h de estimulação com bloqueio da brefeldina (Figura 4.15.F), não encontramos diferenças significativas na expressão de CD107a entre as células estimuladas com DENV-2 (média  $\pm$  erro padrão:  $552,7 \pm 89,0$  MFI,  $n=3$ ) e as células estimuladas com MOCK ( $582,7 \pm 52,4$  MFI) ou não estimuladas ( $570,0 \pm 61,6$  MFI). Para observar se a degranulação estaria ocorrendo precocemente, analisamos as células CD3-CD56+ numa cinética de 0 a 140 minutos (Figura 4.15.G) e ainda assim, não observamos uma marcação diferencial entre os estímulos utilizados (NS,

Mock e DENV-2). Desse modo, no nosso sistema *in vitro*, não foi possível detectar o marcador de degranulação das células NK, mediante estimulação com DENV.

Conforme observamos para as células dos pacientes, também caracterizamos a expressão de TLR3 durante a estimulação viral (18h) em células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (Figura 4.15.H). A expressão de TLR3 foi analisada pelo MFI (Figura 4.15.I), uma vez que, *in vitro*, observamos apenas um pequeno deslocamento da intensidade de fluorescência da marcação. Ainda sim, observamos uma diferença estatística significativa para as células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> que foram estimuladas com DENV-2 (média ± erro padrão: 3404 ± 250 MFI, n=3) e com MOCK (2924 ± 249,4 MFI,  $p=0,002$ ) ou não estimuladas (3114 ± 223,4 MFI,  $p=0,02$ ). Para a população CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> não observamos diferenças significativa, porém existe uma tendência de maior expressão de TLR3 nas células estimuladas com DENV-2 (3434 ± 304,6 MFI) em comparação aos outros grupos (MOCK – 2794 ± 53,7 MFI; NS – 3021 ± 42,8 MFI).



**Figura 4.15: Ativação das células NK em culturas de PBMC pelo DENV-2: expressão de TRAIL, CD107a e TLR3**

As PBMCs de doadores saudáveis foram estimuladas por 18h com DENV-2 MOI 10. As células NK foram analisadas por citometria de fluxo para CD3, CD56, CD16, TRAIL e CD107a na superfície celular e intracelular para TLR3. **(A)** Histograma representativo da marcação de TRAIL nas duas populações de NK (CD3-CD56+CD16- e CD3-CD56+CD16+) selecionadas de acordo com a figura 4.14.A. **(B e C)** Porcentagem de células NK TRAIL+ selecionadas em PBMCs após estimulação por DENV-2 (azul), Mock (laranja) ou NS (cinza). Em **B** são mostrados os resultados para 12 doadores. **(C)** Células NK positivas para TRAIL em diversos MOIs de DENV-2 (10; 1; 0,1) após 18h de estimulação (n=8). **(D)** Histograma representativo da marcação de CD107a em células NK totais (CD3-CD56+) e mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das células NK totais estimuladas por 18h sem brefeldina **(E)** ou por 6h com brefeldina **(F)** com DENV-2, Mock ou não estimuladas, para 3 doadores cada. **(G)** Cinética de 0 a 140 minutos da expressão de CD107a (MFI) em células NK totais de

PBMCs estimuladas com DENV-2, Mock ou não estimuladas. (H) Histograma representativo da marcação de TLR3 nas duas populações de NK (CD3-CD56+CD16- e CD3-CD56+CD16+) selecionadas de acordo com a figura 4.13.A. (I) Medianas da intensidade de fluorescência (MFI) das células NK CD3-CD56+CD16- e CD3-CD56+CD16+ estimuladas por 18h com DENV-2, Mock ou não estimuladas. Dados foram analisados por teste estatístico t Student em que \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$  e \*\*\*  $p < 0.0005$ .

Desse modo, nosso modelo *in vitro* aponta para o aumento da expressão de TRAIL e um aumento sutil de TLR3 em células NK durante a estimulação das culturas com o DENV-2.

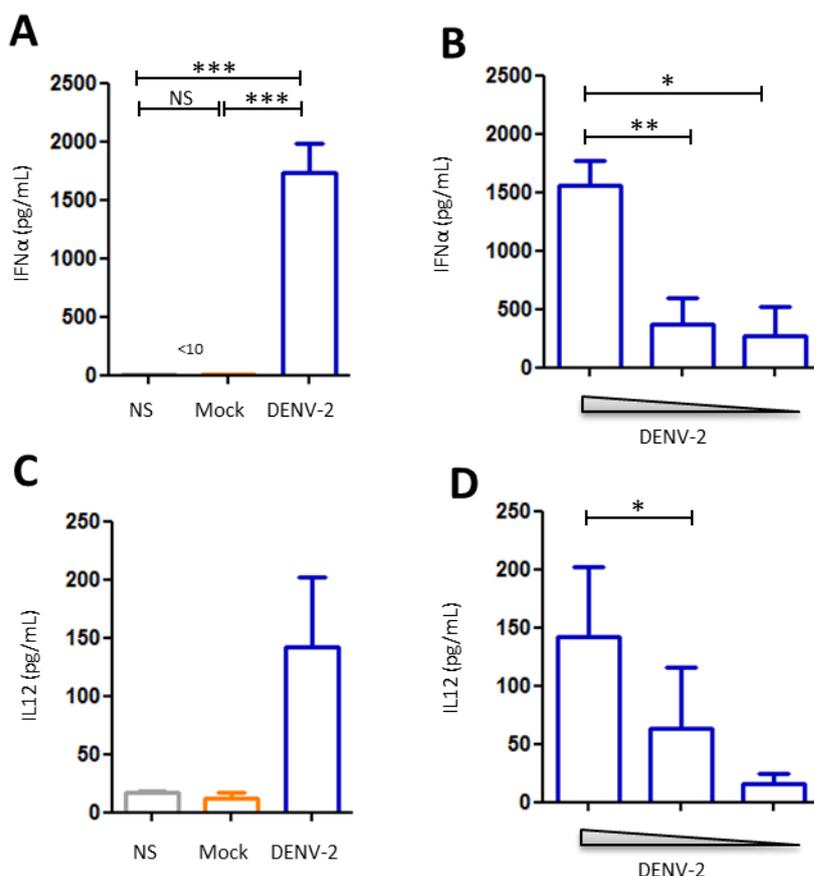
#### 4.5.3 Influência dos fatores solúveis nas células NK durante a estimulação viral de PBMCs

As células NK podem sofrer influência de diversas citocinas durante a infecção, que atuam na expansão das populações, mas também na citotoxicidade e produção de IFN $\gamma$  (329). De modo a esclarecer se a ativação das populações é causada diretamente pelo vírus ou é auxiliada pela produção de citocinas pelas outras populações celulares, acessamos a produção de citocinas relacionadas à ativação das células NK no sobrenadante das culturas estimuladas com DENV-2 e controles.

O IFN $\alpha$  é um estimulador do aumento da citotoxicidade das células NK. Observamos que (Figura 4.16.A) a estimulação com DENV-2 MOI10 é capaz de induzir níveis elevados de IFN $\alpha$  ( $1554 \pm 221,2$  pg/mL,  $n=12$ ) quando comparado ao Mock ( $7,5 \pm 0,5$  pg/mL,  $p=0,0002$ ) e à produção basal pelas células (NS –  $8,1 \pm 0,5$  pg/mL,  $p=0,0002$ ). A produção de IFN $\alpha$  nas culturas foi dependente do MOI utilizado (Figura 4.16.B). A estimulação com MOI 1 ( $367,2 \pm 229,0$  pg/mL) e MOI 0,1 ( $265,9 \pm 250,9$  pg/mL) não induziu níveis significativamente diferentes que os níveis da citocina no Mock, porém tiveram médias maiores que estes e foram menores que os níveis utilizados no MOI 10 ( $p=0,009$  e  $p=0,01$ , respectivamente).

A citocina IL12 sozinha é fraca indutora de citotoxicidade, mas pode agir em sinergia com outras citocinas. Em geral, a citocina IL12 é um dos principais fatores para a produção de IFN $\gamma$  pelas células NK e um indutor de resposta Th1 (329). Nas culturas de PBMCs, observamos a produção dessa citocina (Figura 4.16.C). O MOI10 de DENV-2 foi capaz de induzir a produção de IL12 em maiores níveis ( $141,5 \pm 61,1$  pg/mL,  $n=3$ ) comparado aos controles (NS –  $16,3 \pm 1,6$  pg/mL; Mock –  $11,3 \pm 3,4$  pg/mL). A produção de IL12 também parece ser dose dependente (Figura 4.16.D). Observamos uma diferença significativa entre a produção induzida pelo

MOI10 e MOI1 ( $63,0 \pm 53,3$  pg/mL,  $n=3$ ,  $p=0,01$ ), enquanto a produção induzida pelo MOI 0,1 foi similar aos níveis basais ( $16,1 \pm 8,5$  pg/mL). Foram dosados também os níveis de IL15, nas mesmas condições citadas acima, porém todas as culturas revelaram dosagens abaixo do limite da curva. Assim, foi possível observar que IL12 e IFN $\alpha$  são induzidos pelo DENV-2 em cultura, enquanto IL15 não foi encontrada.



**Figura 4.16: Produção de IFN $\alpha$  e IL12 durante a estimulação de PBMCs com DENV-2**

As PBMCs de doadores saudáveis foram estimuladas com DENV-2 (MOIs 10; 1; 0,1) e controles negativos (mock e meio) e o sobrenadante foi armazenado e dosado por ELISA. **(A)** Níveis de IFN $\alpha$  por ELISA do sobrenadante das PBMCs estimuladas com DENV-2 MOI 10 (azul), mock (laranja) ou não estimuladas (cinza) por 18h (12 doadores). **(B)** Detecção do IFN $\alpha$  por ELISA do sobrenadante das PBMCs estimuladas com DENV-2 MOI 10, 1 e 0,1 por 18h (8 doadores). **(C)** Níveis de IL12 nas PBMCs estimuladas por 18h com DENV-2 MOI10 (3 doadores) e também com MOI 1 e MOI 0,1 **(D)** dosadas por ELISA. Dados analisados pelo teste estatístico t Student em que \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ .

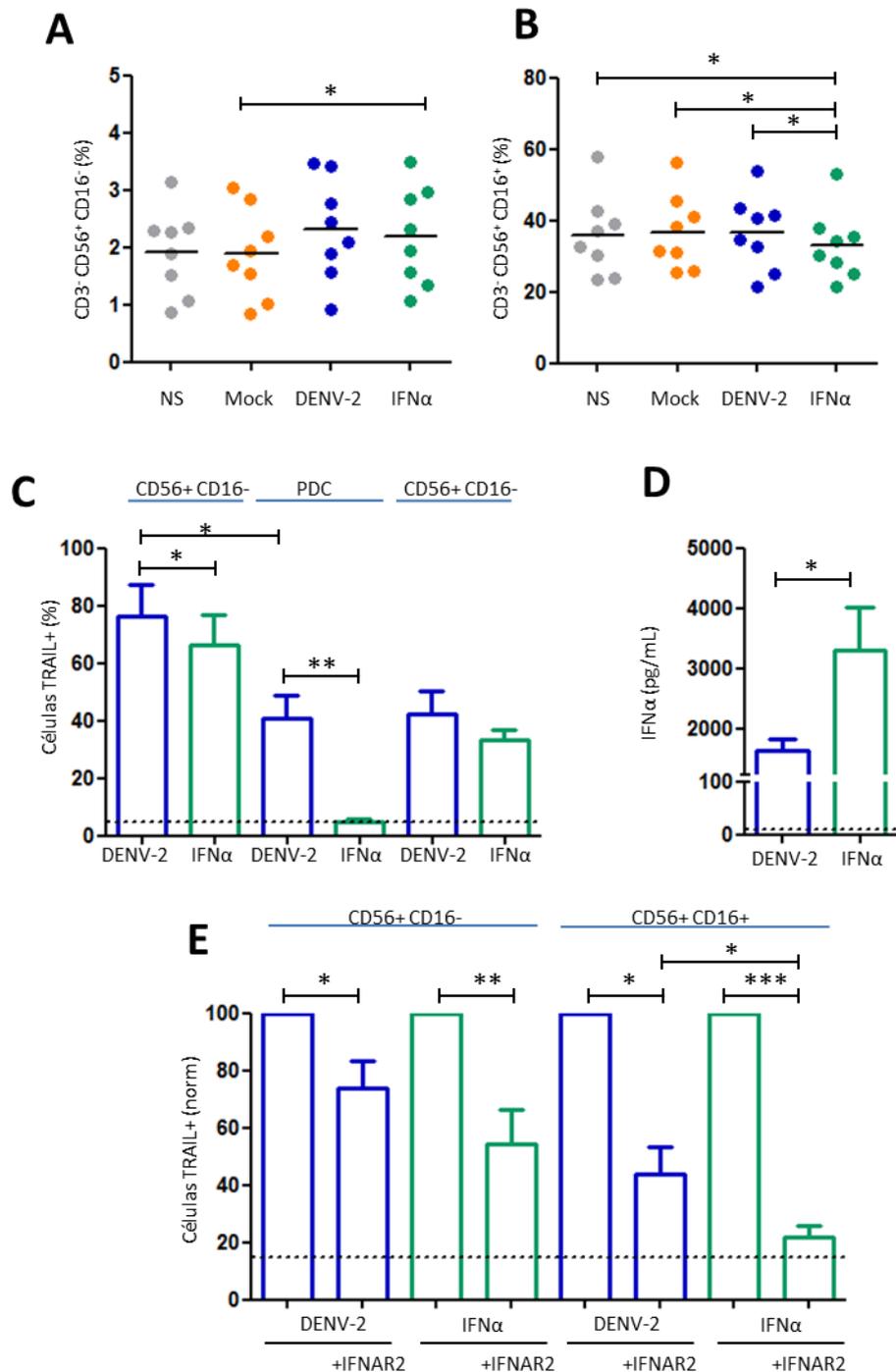
Uma vez que, em células NK, a via dos interferons é responsável pela indução de TRAIL que, portanto, auxilia a ativação de células NK, investigamos os efeitos do tratamento com IFN $\alpha$  recombinante na frequência das células NK durante as estimulações ([Figura 4.17.A](#)). Observamos um aumento sutil na frequência de células NK CD3 $^-$ CD56 $^+$ CD16 $^-$  quando as PBMCs são estimuladas com IFN $\alpha$ . Entretanto, DENV-2 induziu alteração positiva na frequência de células NK CD3 $^-$

CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> quando comparado à frequência observada durante a estimulação com Mock ( $p=0,06$ ), IFN $\alpha$  ( $p$  não significativo) ou não estimulados ( $p=0,06$ ). Ainda sim, a estimulação com IFN $\alpha$  ( $2,2 \pm 0,3$  %,  $n=8$ ) exibiu maiores frequências de CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> que Mock ( $1,9 \pm 0,3$ ,  $p=0,03$ ) ou em comparação à frequência da condição sem estímulo ( $1,9 \pm 0,3$ %,  $p=0,06$ ). A frequência das células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (Figura 4.17.B) parece estar diminuída nas culturas tratadas com IFN- $\alpha$  (média  $\pm$  erro padrão:  $33,2 \pm 3,7$ ,  $n=8$ ) quando comparada ao tratamento com DENV-2 ( $36,6 \pm 3,7$ ;  $p=0,01$ ), Mock ( $36,8 \pm 3,7$ ;  $p=0,02$ ) ou não estimuladas ( $35,9 \pm 4,0$ ;  $p=0,04$ ). Nessa análise, a frequência de células NK não variou entre as PBMCs estimuladas com DENV-2 ou Mock ou não estimuladas. Desse modo, os dados mostram uma regulação diferencial do IFN $\alpha$  na expansão de acordo com a população de células NK estudadas.

Em seguida, foram observados os efeitos do IFN $\alpha$  na expressão de TRAIL nas células NK, analisando também a população de PDCs (Figura 4.17.C). Observamos que a expressão de TRAIL nas células NK foi maior quando estimuladas com DENV-2 em comparação a estimulação com IFN $\alpha$  recombinante tanto para as células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (média  $\pm$  erro padrão, DENV-2 –  $76,2 \pm 11,2$ % versus IFN $\alpha$  –  $66,7 \pm 10,3$ %;  $n=8$ ;  $p=0,03$ ) quanto para as CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (DENV-2 –  $42,4 \pm 7,9$ % versus IFN $\alpha$  –  $33,3 \pm 3,4$ %;  $n=8$ ). Interessante notar que a expressão de TRAIL foi mais alta nas PDCs estimuladas com DENV-2 ( $40,9 \pm 8,1$ %) em comparação ao estímulo com IFN $\alpha$  ( $4,8 \pm 1,0$ %;  $n=8$ ;  $p=0,003$ ). Observa-se também que as células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> tem maior expressão de TRAIL na membrana que à PDCs ( $p=0,01$ ), enquanto as células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> têm, em média, expressão em níveis similares às PDCs. Uma correlação positiva entre a porcentagem de TRAIL na membrana das células NK e os níveis de IFN $\alpha$  na cultura foi calculada tanto para as células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (Spearman  $r=0,7$   $p=0,0005$ ) quanto para CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (Spearman  $r=0,6$   $p=0,005$ ). Esses dados sugerem fortemente a influência do IFN $\alpha$  na expressão de TRAIL nas células NK.

Uma vez que os níveis de TRAIL induzidos pelo IFN $\alpha$  nas células NK são maiores na estimulação pelo DENV-2, buscou-se avaliar se a produção de IFN $\alpha$  nessas culturas era maior que o IFN $\alpha$  recombinante administrado. Observamos (Figura 4.17.D) que os níveis da citocina produzidos pela estimulação por 18h com DENV-2 (média  $\pm$  erro padrão:  $1642 \pm 195,8$  pg/mL) foram em média a metade dos valores observados nas culturas tratadas com 150 ng/mL do IFN $\alpha$  recombinante

( $3309 \pm 715,7$  pg/mL;  $n=8$ ;  $p=0,04$ ). Para esclarecer o papel do IFN $\alpha$  na expressão de TRAIL em células NK durante a estimulação com o DENV-2 (Figura 4.17.E), as células foram pré-tratadas com anticorpos neutralizantes anti-IFNAR2 60 min antes da estimulação. Para observar a efetividade do bloqueio dos interferons do tipo I, os efeitos do IFN $\alpha$  recombinante também foram observados. Tanto as células CD3 $^-$ CD56 $^+$ CD16 $^-$  (média dos valores normalizados em relação à porcentagem de TRAIL no estímulo sem a adição do anticorpo neutralizante  $\pm$  erro padrão:  $53,5 \pm 11,6\%$ ;  $n=6$ ;  $p=0,009$ ) quanto as CD3 $^-$ CD56 $^+$ CD16 $^+$  ( $21,8 \pm 4,0\%$ ;  $p=0,0005$ ) exibiram diminuição da detecção de TRAIL em relação às células NK não tratadas com o anticorpo neutralizante. Assim, para as células CD16 $^-$  e CD16 $^+$  foi observada em média 50% e 80% da inibição do TRAIL membranar, respectivamente. Para o estímulo DENV-2, observou-se o mesmo efeito inibitório, porém em menor intensidade que as células estimuladas com IFN- $\alpha$  (CD3 $^-$ CD56 $^+$ CD16 $^-$  -  $73,7 \pm 9,6\%$ ;  $p=0,04$ ; CD3 $^-$ CD56 $^+$ CD16 $^+$  -  $43,8 \pm 9,2\%$ ;  $p=0,01$ ) de aproximadamente 30% e 50% ( $p=0,02$ ), respectivamente. Esses dados mostram que a inibição dos receptores IFNAR foi mais efetiva para as células CD3 $^-$ CD56 $^+$ CD16 $^+$  e que o IFN $\alpha$ , assim como os interferons do tipo I, contribuem para a expressão de TRAIL nas células NK, não descartando o envolvimento de outros fatores.



**Figura 4.17: Relação entre a Indução de TRAIL membranar em células NK pelo DENV-2 e os interferons tipo I**

As PBMCs de doadores saudáveis foram estimuladas por 18h com DENV-2 MOI 10 (azul), 150 ng/mL de IFNα (verde) e Mock (laranja) ou não estimuladas (cinza). As células NK foram marcadas por citometria de fluxo extracelular para CD3, CD56, CD16 e TRAIL e as PDCs foram marcadas para CD4, CD11c, BDCA4 e TRAIL e o sobrenadante foi dosado por ELISA. Porcentagem de células NK CD3- CD56+ CD16- (A) e CD3- CD56+ CD16+ (B) de 8 doadores em PBMCs estimuladas por 18h com DENV-2, mock, IFNα recombinante ou não estimuladas. (C) Células NK CD3-CD56+CD16-, células NK CD3-CD56+CD16+ ou PDCs CD4+CD11c-BDCA4+ positivas para TRAIL em PBMCs tratadas com DENV-2 ou IFNα (n=6). (D) Dosagem de IFNα nas culturas por ELISA para PBMCs estimuladas com DENV-2 ou IFNα (n=8). (E) As PBMCs (n=6) foram pré-tratadas (60 min) ou não com 1,5 µg/mL de anticorpo anti-IFNAR2 e em seguida, estimuladas com DENV-2 ou IFNα por 18h. O gráfico mostra valores normalizados das células TRAIL+ de cada estímulo (DENV-2 ou IFNα) + anti-IFNAR2 em relação ao parâmetro do respectivo estímulo e população celular sem o uso do anticorpo neutralizante. As linhas tracejadas nos gráficos de barra representam a média dos valores observados para sem o uso de estímulos. Dados analisados por teste estatístico pareado T Student em que \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$  e \*\*\*  $p < 0.0005$ .

Sumarizando os resultados do estudo das células NK:

Observou-se em pacientes durante a fase aguda da infecção natural por DENV que as duas subpopulações de células NK estão aumentadas nos casos mais brandos da doença. Ainda, os marcadores de citotoxicidade estudados - TRAIL e CD107a - tem maior positividade nas células dos pacientes, assim como acontece com o marcador de ativação TLR3. No caso do TRAIL e do TLR3, foi observada uma maior expressão nos casos mais brandos da doença. As citocinas correlacionadas com a ativação das células NK, IFN $\alpha$  e IL12, foram determinadas também nos casos brandos da doença. A IL12 apresentou uma correlação positiva com TRAIL solúvel, enquanto a IL15 não foi detectada diferencialmente. Assim, células NK expressando TRAIL, CD107a e TLR3 podem ser consideradas como associadas a um bom prognóstico para FD, assim como a presença de IL12 e IFN $\alpha$ .

No modelo *in vitro* de estimulação de PBMCs, observou-se a alteração de frequência durante a estimulação pelo DENV para a subpopulação CD3 $^-$ CD56 $^+$ CD16 $^-$  mas não na subpopulação CD3 $^-$ CD56 $^+$ CD16 $^+$ . A expressão de TRAIL nessas populações foi dose viral dependente e maior na subpopulação CD16 $^+$ . O TLR3 apresentou um sutil aumento na expressão na subpopulação CD16 $^-$ . Nenhuma alteração na expressão de CD107a foi observada com ou sem brefeldina e em pontos de análise precoce (minutos) ou tardio (dias). Foram encontrados níveis de IFN $\alpha$  e IL12 nas culturas de PBMCs estimuladas com DENV-2 de maneira dose viral dependente.

O IFN $\alpha$  recombinante foi capaz de induzir a expressão de TRAIL nas duas subpopulações de células NK, em maiores níveis na subpopulação CD16 $^-$ . Num mesmo sistema e com mesmos doadores, os níveis de TRAIL foram maiores nas células NK CD16 $^-$  em comparação aos níveis nas células NK CD16 $^+$  e PDCs, sendo similares nessas duas populações celulares. Os níveis de IFN $\alpha$  recombinante, mesmo sendo superiores aos níveis detectados nas culturas estimuladas com DENV-2, não foram suficientes para induzir as mesmas porcentagens de TRAIL expressas nas células NK durante a estimulação com DENV-2. O bloqueio dos IFNARs foi capaz de reduzir a expressão de TRAIL nas células NK, porém em maior eficiência nas células NK CD16 $^+$ .

## 5 Discussão

---

A febre da dengue é uma doença febril autolimitante que gera imunidade duradoura frente ao sorotipo infectante, mesmo nos casos graves (427). Esse fato sugere que a desregulação na resposta imunológica inata é fator crucial para a gravidade da doença. De fato, as células do sistema mononuclear fagocítico, pertencentes à imunidade inata, são alvo replicativo para o DENV e são capazes de produzir, quando infectadas, uma variada gama de mediadores solúveis inflamatórios. Estes fatores seriam colaboradores na indução da ampla permeabilidade vascular que levaria ao choque hipovolêmico nos casos mais graves da dengue. Sabe-se que durante o ponto crítico da doença não são detectadas partículas virais na circulação sistêmica, sugerindo assim que o vírus tenha sido controlado e que a resposta imunológica inflamatória induzida seria responsável pela ativação endotelial. Os dois tipos celulares estudados nesse trabalho - as PDCs e as células NK - são fundamentais para o controle viral precoce durante as infecções em geral. De fato, mostramos a ativação dessas células e discutiremos seu envolvimento na imunopatologia da dengue à luz dos resultados obtidos.

### 5.1 As PDCs durante a infecção pelo vírus Dengue

As PDCs estão presentes no sangue periférico e são rapidamente ativadas frente à detecção das partículas virais circulantes. As PDCs ativadas modulam os seus receptores de superfície: o aumento da expressão de TRAIL caracteriza uma função citotóxica, o aumento de CCR7 permite a migração para os linfonodos, o aumento da expressão de MHC de classe II permite a apresentação antigênica e a produção de interferons do tipo I leva à diversos efeitos biológicos autócrinos e parácrinos, como a produção de TRAIL solúvel por outros tipos celulares e interferência na replicação viral – sua função clássica.

Estudamos primeiramente o estado de ativação das PDCs em pacientes durante a fase aguda da infecção por DENV. Desse modo foi observado nos pacientes mais brandos a maior ativação das PDCs, indicando a possível função protetora, embora as células não tenham seus números aparentemente alterados.

Outras infecções virais mostram que existe uma correlação entre os números de PDCs do sangue periférico e a gravidade da doença. Como já foi citado, existem

ainda poucos trabalhos que estudam o envolvimento das PDCs no estabelecimento de infecções. Um menor número de PDCs no sangue periférico foi associado a pacientes HIV (270, 428) e HCV crônicos (280) não submetidos a terapia antiviral. Já os pacientes submetidos à terapia antirretroviral exibiram uma recuperação nos números de PDCs periféricas (270, 279, 429). Nesse contexto, a contagem de PDCs circulantes foi inversamente associada a carga viral (280, 429). No caso do HIV, é possível que a depleção de PDCs possa estar ligada a infecção dessas células, uma vez que PDCs expressam o receptor viral CD4 (269).

Os estudos com flavivírus até o momento focaram a interação das PDCs com o vírus DENV. Pichyangkul e col. (2003) apresentaram o primeiro estudo em crianças com dengue e observaram que a frequência da população de PDCs em casos brandos foi maior que a frequência dos casos graves, que foi similar aos controles saudáveis. Entretanto, determinando-se os números absolutos, foi observada uma queda significativa na frequência das PDCs dos casos graves (119). Porém, as PDCs em adultos apresentaram cinéticas ligeiramente diferentes. Concordando com nosso estudo, De Carvalho Bittencourt e col. (2012) não encontraram uma associação significativa entre a frequência das PDCs e a gravidade da FD (120). Vale ressaltar que a classificação dos pacientes pode explicar a diferença nos resultados obtidos: Pichyangkul e col. utilizaram a classificação de 1997 da OMS, enquanto no nosso trabalho e De Carvalho Bittencourt e col. os pacientes foram divididos de acordo com a nova classificação de 2009. Os números de PDCs circulantes podem variar de acordo com a fase da doença. De Carvalho Bittencourt e col. observaram uma correlação inversa entre a frequência de PDCs e o tempo de infecção. Tsai e col., em um estudo longitudinal, observaram uma flutuação da frequência das PDCs no sangue periférico e um pico máximo 5 dias após o início da febre (430).

Devido ao reduzido número de pacientes e à dificuldade logística em se obter amostras de fase convalescente, agrupamos os pacientes de fase aguda (3 a 8 dias de febre), o que pode ter prejudicado a análise precisa da relação entre a frequência das PDCs e gravidade da doença. Entretanto, observamos uma tendência de diminuição das PDCs dos pacientes em comparação à células dos controles saudáveis. Explicações plausíveis para uma depleção de PDCs no sangue periférico envolvem (1) a morte das PDCs, (2) diminuída produção pela medula óssea e (3) migração para periferia. PDCs dos linfonodos de pacientes HIV+ não tratados

exibem perfil apoptótico com diminuição de Bcl-2 e aumento de caspase-3 (431), porém nada se sabe sobre a apoptose de PDCs durante a dengue. Sabe-se que o DENV pode interferir na produção de células pela medula óssea. O DENV foi isolado desse tecido tanto em casos fatais humanos (30, 432), quanto em modelo primata não humano (433) e pode ser responsável pela supressão da medula óssea (434). Nada se conhece sobre a migração periférica das PDCs durante a dengue, porém, nos casos do HIV, a depleção de PDCs do sangue pode ser explicada pela sua migração para os órgãos periféricos, como o baço (271) ou linfonodos (431). Desse modo, mais estudos são necessários para confirmar a depleção de PDCs durante a dengue.

Não somente os números de PDCs no sangue periférico, mas o seu estado de ativação são importantes durante as infecções virais. As PDCs ativadas primariamente produzem IFN $\alpha$ , mas também expressam TRAIL em sua membrana e outros marcadores de maturação como CD40, CD80 e CD86. Apenas um trabalho relata a expressão de TRAIL em PDCs de pacientes, mas não durante a dengue. Sary e col. (2009) demonstraram que pacientes HIV+ virêmicos exibem maiores números de PDCs TRAIL+ (435). A ativação nesse caso foi associada positivamente à carga viral e inversamente ao número de células CD4+ no sangue periférico. No caso do HIV, a ativação crônica do sistema imunológico é correlacionada com a progressão mais rápida da doença. O papel das PDCs no HIV estaria relacionado com a indução de apoptose, observada no tecido linfóide periférico, das células TCD4 infectadas ou não em razão da sua expressão dos receptores TRAIL-R1 e TRAIL-R2 (435, 436). As propriedades imunoestimulatórias das PDCs poderia contribuir para a imunopatogenia, mas também seriam importantes na proteção durante o estabelecimento das infecções. Por exemplo, no caso do HCV crônico, Shen e col. (2010) observaram que as PDCs expressam CD86 e também PDL1, molécula inibitória, nos pacientes, porém a taxa PDL1/CD86 está maior nos casos de doença. A expressão de PDL1 foi correlacionada inversamente com a carga viral e essas PDCs foram pouco estimulatória frente às TCD4 autólogas. Nesse caso, a reduzida propriedades imunoestimulatória das PDCs foi correlacionada com a gravidade da doença (283).

No caso da dengue, encontramos maior ativação das PDCs, com relação ao marcador TRAIL, nos casos mais brandos da doença. Nossos dados estão de acordo com o trabalho publicado por Torres e col. (2013) que não relatam nenhuma

diferença na frequência de PDCs entre os vários quadros de dengue, mas observam diferenças significativas no estado de ativação destas. A investigação aponta que TLR9 é diferencialmente aumentado nas PDCs dos casos mais brandos. O marcador de maturação CD86 tem menor expressão nos quadros mais graves de dengue (DHF) em relação aos controles. Por outro lado, a expressão de TLR2 aumentada foi encontrada nos casos mais graves da doença (77). Esses dados combinados sugerem que a ativação das PDCs durante a fase aguda da dengue seria importante na evolução do quadro clínico. De fato, Sariol e col. (2011) apontam, em modelo primata não-humano, que a administração de agonistas dos receptores TLR, dois dias após a inoculação viral, desencadeia a maior expressão de CD40 e CD86 nas PDCs, correlacionando inversamente a ativação das PDCs com a viremia (78). Apesar de não envolver estudos de fenótipos de ativação, Pichyangkul e col. e De Carvalho Bittencourt encontraram associações inversas entre os números de PDCs no sangue periférico e a viremia nos casos de dengue. Uma vez que a carga viral é correlacionada com a gravidade da doença (53, 424), podemos supor que o bloqueio da ativação das PDCs contribuiria para o descontrole da carga viral.

O reconhecimento viral pelas PDCs leva a produção de robustas quantidades de IFN $\alpha$ . Apesar de não serem as únicas células a produzirem IFNs do tipo I, elas são as maiores produtoras durante a estimulação viral no sangue periférico e, uma vez que os IFNs do tipo I tem produção de retroalimentação positiva, a detecção de IFN $\alpha$  no plasma foi considerada um reflexo da ativação das PDCs do sangue (130, 437). Em nosso grupo de pacientes brasileiros, observamos os maiores níveis de IFN $\alpha$  na fase aguda nos plasmas de pacientes brandos (FD). Esses resultados sugerem que a ativação da via dos IFNs do tipo I seria um marcador de bom prognóstico durante a infecção. Investigações de outras coortes geográficas suportam os nossos resultados. Kurane e col. foram os primeiros a relatarem a presença de IFN $\alpha$  em crianças com quadros clínicos de FD e FHD, porém nenhuma diferença marcante entre os grupos foi observada na fase aguda, observando-se a persistência de altos níveis da citocina nos casos graves (438). Chen. e col. (2007) e Ubol e col. (2008) demonstraram a detecção diferencial de IFN $\alpha$  em crianças com quadros mais brandos de FD (112, 439). Becquart e col. foram os primeiros a relatarem níveis mais elevados da citocina em pacientes adultos nos casos mais brandos (440), corroborados pelos dados de Ubol e col (2010) (441). Suportando os

nossos resultados e o de outros grupos, diversos genes relacionados a via ou ativação pelos IFNs do tipo I são expressos durante a FD. Hoang e col. observam o aumento da transcrição dos genes STAT1, STAT3, IFF7 e IRF9 em PBMCs durante os casos de dengue, mostrando a importância dessa via durante a infecção (442). Simmons e col. observaram a diminuída expressão celular de *Mx1*, *Mx2*, *ISG15*, *IFIT2* e *OAS3* em quadros de choque pelo dengue (443). Ubol e col. (2008) observaram maiores níveis transcricionais de *IFI27*, *IFI44*, *IFIH1*, *IFIT1*, *ISG15*, *Mx1*, nos casos FD em comparação a FHD (439). Long e col. também relatam a abundância de genes estimulados por interferons (ISGs), em PBMCs de crianças, nos casos não complicados de FD em comparação aos quadros de choque (444). Por fim, modelos murinos com deleção do gene IFNAR1 apresentam infecção letal pelo DENV (84, 445). Assim, essas evidências mostram que os IFNs do tipo I ativariam a resposta antiviral nas células alvo, acelerando o processo de clearance viral.

Os interferons são indutores da expressão de TRAIL na superfície das células imunológicas, e também induzem a produção desse mediador na forma solúvel pelos monócitos, por exemplo. O TRAIL tem ação antiviral *in vitro* contra DENV (117), porém pouco se sabe sobre seu papel durante a patogênese da dengue. Becerra e col. (2008) observaram a maior produção do TRAIL solúvel na fase febril da doença (85) e Sun e col. (2013) apontam a sua maior expressão gênica durante a fase aguda (417). Em nossa coorte, observamos os maiores níveis de TRAIL nos casos mais brandos, sugerindo uma relação com a proteção. Os menores níveis de IFN $\alpha$  nos pacientes graves podem interferir negativamente nos níveis de TRAIL. Sabe-se que o TRAIL sinaliza via seus receptores de morte e receptores “decoy”, entretanto, nada se sabe sobre a expressão destes receptores durante a infecção natural pelo DENV. Provavelmente o eixo PDCs – IFN $\alpha$  – TRAIL seja fundamental na resposta imunológica. Do mesmo modo que as PDCs, o papel do TRAIL pode estar relacionado tanto a proteção quanto a progressão para gravidade. Por exemplo, observam-se níveis elevados de TRAIL nos pacientes não submetidos a terapia antiretroviral, cuja utilização demonstra a queda dos níveis da citocina (446). Os nossos dados apontam que o contrário pode estar acontecendo na dengue em que observamos a reduzida ativação das PDCs e suas vias antivirais durante a Dengue Grave.

Uma das consequências da menor ativação das PDCs seria a menor produção dos fatores solúveis antivirais durante o estabelecimento da dengue. De fato, PDCs de pacientes com dengue possuem reduzida capacidade em produzir IFN $\alpha$  *in vitro* quando comparada às PDCs de doadores saudáveis, de acordo com a literatura (119). Esses dados sugerem que o DENV poderia bloquear a função das PDCs escapando do reconhecimento ou bloqueando a sua ativação. Por exemplo, expressão insuficiente de TLR9 nas PDCs resultaria pela ineficiência da resposta de IFNs do tipo I em pacientes HBV crônicos (281, 285). No caso do DENV, a modulação dos TLRs em PDCs durante a infecção mostra a provável interferência viral na expressão de PRRs (77), que também já foi observada durante a infecção *in vitro* de outros PRRs e outros tipos celulares (70). Até o momento, um possível bloqueio por proteínas virais do DENV na produção de IFN $\alpha$  pelas PDCs não foi descrito. É possível que proteínas virais possam inibir sua produção através da ligação ao BDCA2, marcador específico de PDCs e funcionalmente inibidor da produção de IFN $\alpha$  e TRAIL (140, 447). O HIV e o HCV possuem proteínas que podem ligar-se ao BDCA2 e bloquear a produção de IFN $\alpha$  *in vitro* (249-251, 254, 255). Nada se sabe a NS1 circulante nos pacientes de dengue tenha alguma propriedade em se ligar a esses receptores inibitórios. A interferência ou não proteínas virais do DENV na ativação de PDCs ainda deve ser esclarecida. Assim, durante esse trabalho mostramos algumas evidências que suportam o papel protetor dos IFNs tipo I na dengue.

Nossos resultados mostram que PDCs são ativadas *in vitro* diretamente pelo DENV, de maneira dose viral dependente. Observou-se a exposição do TRAIL na superfície das PDCs, uma robusta produção de IFN $\alpha$  e uma pequena modulação do marcador de migração CCR7 e de HLADR, molécula com função de apresentação antigênica. Outros trabalhos na literatura corroboram nossos dados de ativação, porém, ao nosso conhecimento, nenhum determinou os níveis de TRAIL na membrana ou CCR7 nas PDCs estimuladas *in vitro* com DENV. Os relatos anteriores sobre os níveis de IFN $\alpha$  produzidos são contraditórios. Rodriguez-Madoz e col. (2010) não observaram nenhuma produção da citocina quando PDCs foram estimuladas com MOI 1 de DENV2 (448). Corroborando nossos resultados, Wang e col. (2006) descrevem uma robusta produção de IFN $\alpha$  quando MOIs maiores são utilizados (74). Esses trabalhos em conjunto sugerem que a sinalização de IRF7 nas PDCs pode requisitar maior “input” inicial para ser ativada. Sun e col. (2009)

mostram que, além de IFN $\alpha$ , o DENV induz também a produção de outras citocinas inflamatórias como TNF $\alpha$  e IL6. Nesse trabalho, o DENV não altera os marcadores de maturação CD86, CD83 e CD80, mas regula positivamente a expressão de TLR7 em PDCs (90). Nos trabalhos de Sun e col. (2009) e Wang e col (2006), as PDCs foram cultivadas com IL3 antes das estimulações antigênicas e a citocina pode aumentar ligeiramente a expressão de marcadores de maturação (449). Assim, a ausência de regulação das moléculas co-estimulatórias pode indicar um possível bloqueio de ativação de PDCs. Gondois-Rey e col. (2009) mostram que o genoma do HCV é fraco estimulador das PDCs, pois foi capaz de diminuir a expressão de CD86 e CD80, mantendo inalterada a expressão de CD40, CD83 e CCR7. Nesse mesmo trabalho, o vírus Influenza e o vírus herpes (HHV-1) induziram forte aumento de CD83 e CCR7 (449). O mesmo grupo relata que o HCV não foi capaz de induzir TRAIL membranar ou produção robusta de IFN $\alpha$  (260). Não foi possível analisar em nossos experimentos os outros marcadores de maturação. Os marcadores co-estimulatórios, migratórios e de apresentação antigênica parecem sofrer apenas pequena regulação positiva frente a estimulação pelo DENV. Algumas características estimuladoras das PDCs podem ser alvos para um possível escape viral pelo DENV, porém maiores estudos são necessários.

Como citado anteriormente, a replicação do DENV nas PDCs é pouco provável. Nossa hipótese é que a replicação viral não seria responsável por ativar as PDCs e sim o reconhecimento de partículas virais. Nossos resultados – a ausência da detecção de antígenos virais em PDCs estimuladas até 48h em comparação aos monócitos no mesmo período de tempo e a ausência na modulação de TRAILm nas PDCs quando o inóculo viral é tratado com anticorpo neutralizante – apoiam essa hipótese. Entretanto, em dois trabalhos do mesmo grupo, Rodriguez-Madoz e col. (2010) apenas citam que PDCs sofrem replicação viral. Aguirre e col. (2012) exibem detecção de RNA da proteína NS5 nas PDCs em níveis semelhantes aos monócitos e menores que MDDCs, sendo que essas duas células exibem replicação robusta pelo DENV2 (70, 448). Não existem trabalhos publicados mostrando a detecção de antígenos virais ou genoma viral em PDCs de pacientes infectados. O trabalho de Sun e col. (2009) está em acordo com nossos resultados em que não foram encontrados antígenos virais intracelulares nas PDCs após 48h. Entretanto, RNA DENV específico de polaridade negativa (indicador de replicação) foi detectado nas PDCs, porém em números 2 a 3 logs menores que o encontrado nas MDCs (90). Em

conjunto esses dados sugerem que a replicação nas PDCs pode ser abortiva, ou seja, o DENV seria capaz de realizar a fusão das membranas, liberar o capsídeo no citoplasma, iniciar a replicação do genoma viral, porém seria ineficiente em montar e liberar as partículas virais. De fato, outro dois importantes flavivírus, WNV e YFvac, são capazes de ativar as PDCs (produção de IFN $\alpha$ ) aparentemente sem necessidade de replicação viral (289).

Em nosso sistema, observamos que o DENV não infecta as PDCs mesmo quando MOIs altos são utilizados. Levantamos hipóteses que podem explicar esse fato. Considerando que o DENV necessita de um baixo pH para fusão com a membrana celular, e subsequente liberação do genoma no espaço intracelular, a fusão viral estaria ocorrendo no sistema interno de membranas e não na membrana plasmática. Assim, o vírus primeiro necessita ser reconhecido pelas PDCs via endocitose. Por exemplo, nos experimentos de dose-dependência viral observamos que a ativação das PDCs com pequenas quantidades de vírus variou entre doadores. Talvez seja necessário que o receptor de endocitose viral esteja em alta densidade na superfície das PDCs para que ocorra a internalização das partículas virais (275). Essa também pode ser uma explicação plausível para a necessidade de altos MOIs para a ativação das PDCs, como nós observamos nesta investigação, assim como outros trabalhos (74, 90).

De fato, nas células dendríticas mieloides, a expressão de DC-SIGN na membrana, receptor endocítico para o DENV em DCs, correlaciona diretamente com a replicação viral nas culturas (43) e polimorfismos nesse receptor foram associados a gravidade (450, 451). As PDCs não expressam DC-SIGN (90) e o receptor de endocitose para o DENV nas PDCs é desconhecido até o momento. Outra explicação plausível para a ausência de replicação viral pode ser a glicosilação das proteínas do envelope do DENV. Corroborando essa hipótese, o flavivírus WNV crescido em culturas de células de mamífero (Vero) foi capaz de induzir robusta produção de IFN $\alpha$  pelas PDCs quando comparado ao mesmo vírus crescido em células de mosquito (C7/10). Os mesmo inóculos tiveram resultados opostos quando MDCs foram infectadas. A glicosilação parece aumentar a capacidade replicativa, enquanto diminui a detecção dos vírus pelas PDCs (289). De fato, a glicosilação de DENV crescido em células de mosquito foi fundamental para a rápida adsorção das partículas virais em células dendríticas mieloides (42, 452). Talvez a glicosilação da proteína E dos vírus crescidos em linhagem de células de mosquito torne fraca a

ligação entre a proteína E e o receptor endocítico das PDCs, diminuindo tanto a capacidade de replicação viral quanto a capacidade de ativação dessas células. Entretanto, observamos que o DENV foi capaz de produzir robusta produção de IFN $\alpha$  pelas PDCs, sugerindo que o vírus está sendo reconhecido pelas PDCs, ou seja, endocitado. Outro mecanismo que explicaria a infecção abortiva seria a expressão constitutiva de IRF7 pelas PDCs. Observamos que as PDCs não estimuladas produzem níveis de IFN $\alpha$  maiores que os níveis produzidos pelos monócitos infectados pelo DENV2. Uma vez que as PDCs expressam o receptor IFNAR e são capazes de responder a estimulação pelo IFN $\alpha$ , mecanismos antivirais podem estar ativados, prevenindo a replicação viral no citoplasma das PDCs. Ainda, a capacidade em produzir IFN $\alpha$  e expressar TRAIL rapidamente pode ser fundamental para a proteção dessas células contra a infecção pelo DENV.

Desse modo, podemos supor que a ativação das PDCs observada em nosso trabalho seria resultado do reconhecimento das partículas virais nos endossomos das PDCs. Para estudar esta hipótese, utilizamos a cloroquina para interferir na acidez do compartimento endossomal. A cloroquina apresenta-se no meio extracelular na sua forma protonada, sendo incapaz de cruzar membranas. Na sua forma não-protonada, o fármaco pode entrar no compartimento intracelular e torna-se protonada nos compartimentos onde o pH é mais baixo, por exemplo, lisossomos e complexo de Golgi (453). Assim, a cloroquina utilizada nas PDCs pode diminuir a acidez dos endossomos. Os receptores TLR7 e TLR9 localizados nesses compartimentos têm como pré-requisito a acidez para sua ativação. A ativação de TLRs 7 e 9 é realizada pela sua clivagem nos endolisossomos por hidrolases, restringindo a ativação a esses compartimentos (179). Observamos que a ativação das PDCs pelo DENV foi bloqueada quando interferimos na acidez dos endossomos, resultando na diminuição da produção de IFN $\alpha$  e expressão de TRAIL. Observamos também que a degradação viral parece ser um processo fundamental para a translocação rápida de TRAIL para a membrana. Nossos resultados sugerem que o DENV é reconhecido nos endossomos, após degradação viral e a ativação dos TLRs virais levaria à produção de IFN $\alpha$  e co-localização de TRAIL com a membrana plasmática. Wang e col. (2006) mostraram que a acidez endossomal é necessária para a produção de IFN $\alpha$  pela PDCs estimuladas com DENV2, Influenza e agonistas sintéticos de TLR7 (R848) e TLR9 (CpG 2236). O papel do TLR7 é confirmado pelo uso do antagonista de TLR7 IRS661. Sun e col. (2009) observaram a necessidade

de maiores concentrações de cloroquina para bloquear a produção de IFN $\alpha$  pelo DENV2, assim como utilizamos nesse trabalho. Talvez maiores concentrações de cloroquina sejam necessárias para bloquear a acidez endossomal e por consequência, a ativação do TLR7. Lembrando que o DENV realiza a fusão com a membrana endossomal em pH ácido (6,0-5,0), um possível viés nos experimentos com cloroquina seria que o pH ácido é inibitório tanto da fusão viral quanto da ativação dos TLRs. Entretanto, na literatura, observa-se que DENV inativado por UV é capaz de induzir quantidades similares de IFN $\alpha$  ao vírus infeccioso (90), sugerindo que a via endossomal é suficiente para ativar as PDCs.

Nossas imagens de microscopia 3D mostram que o uso da cloroquina impede a degradação da partícula viral em concomitância com o bloqueio da expressão de TRAIL na membrana extracelular das PDCs, confirmando os dados da citometria de fluxo para o TRAIL. Assim como Wang e col. (2006) conseguimos detectar a presença de partículas virais em momentos precoces da estimulação, mostrando que a adsorção viral ou a degradação viral são eventos de rápido acontecimento. Por fim, a ausência da detecção de antígeno envelope do DENV nas PDCs sem tratamento com cloroquina e os resultados com anticorpo neutralizante da fusão viral suportam que o reconhecimento viral seja o principal mecanismo de ativação das PDCs pelo vírus DENV-2 em nosso sistema de estudo. Uma questão a ser respondida é porque as PDCs não são permissivas a infecção pelo DENV. Talvez modelos experimentais de inibição direta do TLRs intraendossomais possa ser esclarecedora.

A produção de IFN $\alpha$  e a expressão membranar de TRAIL caracterizam o fenótipo de PDCs “Killers” ou IKPDCs. A denominação “Killer” provem da expressão de moléculas de citotoxicidade e também da sua capacidade em induzir a apoptose em células tumorais e infectadas. Chaperot e col. (2006) foram os primeiros a descrever o potencial citotóxico dessas células utilizando a linhagem celular GEN2.2 de PDCs (218). Diversos agonistas, dentre eles o vírus Influenza e o oligonucleotídeo CpG, foram capazes de induzir a produção de IFN $\alpha$  e a expressão de TRAIL membranar. Essa equipe demonstra que PDCs normais foram capazes de induzir a lise de células de linhagem epitelial. Em seguida, Barblu e col. (2012) foram os primeiros a mostrar que as IKPDCs são capazes de induzir a apoptose de células T infectadas pelo HIV (275). Desse modo, analisamos quais seriam os efeitos das

IKPDCs na infecção pelo Dengue, com relação ao seu mecanismo antiviral ou citotóxico.

Nossos dados sugerem que talvez o DENV possa subverter a ativação das PDCs, uma vez que, em pacientes, menor ativação foi encontrada e, *in vitro*, grande quantidades de vírus são necessárias para ativar as células. Chaperot e col. (2006) mostraram que o CpG é capaz de ativar a expressão de TRAIL nas PDCs, sendo esse citotóxico contra linhagens tumorais (218). O CpG é capaz de induzir o aumento dos marcadores de ativação das PDCs, mostrando uma ativação eficiente desta população (454). As PDCs estimuladas com CpG também são eficientes IKPDCs, conforme mostrado por Barblu e col. (2012), em um mecanismo TRAIL específico. Assim, escolhemos essas IKPDCs para estudar durante a infecção *in vitro* pelo DENV2.

Vários trabalhos publicados estudam o potencial apoptótico das IKPDCs pela expressão de TRAIL na superfície (214). A possível ação antiviral das IKPDCs foi observada em apenas um modelo para HIV (220). Por essa razão, escolhemos o modelo de infecção de monócitos humanos que replicam eficientemente o DENV para acessar a interferência da produção de antígeno viral por IKPDCs. Nossos resultados mostram que as IKPDCs são efetivas em reduzir a replicação viral. O mecanismo antiviral observado foi a diminuição da taxa de infecção, e não a apoptose das células infectadas, explicada por uma via dependente de IFN $\alpha$  e, a princípio, independente de TRAIL membranas nas PDCs.

A função do TRAIL presente na membrana das PDCs em reduzir a carga viral não foi observada. Supreendentemente, nenhum bloqueador da via do TRAIL (anticorpo neutralizante anti-TRAIL ou DR5 solúvel) foi capaz de inibir o efeito antiviral observado. O efeito antiviral do TRAIL solúvel em monócitos infectados pelo DENV2, descrito por Warke e col. (2008), foi confirmado (117). Entretanto, em nosso trabalho, o TRAIL foi eficiente antiviral apenas quando administrado antes da adsorção viral, com pequeno efeito antiviral quando adicionado após a infecção (dados não mostrados). No trabalho de Warke e col. (2008) nada é citado sobre a administração pós-infecção. Uma possível explicação para o efeito antiviral observado seria a indução de ISGs pela administração de TRAIL que protegeria uma parte dos monócitos da infecção viral (455). Ainda, como discutido por Warke e col., pouco se conhece sobre as vias do TRAIL-R não relacionadas a apoptose. Assim

como Warke e col. (2008), nós temos evidências preliminares que os monócitos pré-tratados com TRAIL não exibem perfil apoptótico (dados não mostrados), sugerindo que outra via estaria sendo ativada e protegendo os monócitos. O TRAIL é capaz de induzir a produção de outros fatores solúveis pelas células monocíticas (456) que podem estar envolvidos, por exemplo, na diminuição de receptores endocíticos e diminuir a adsorção viral. Outra possível explicação seria: o IFN $\alpha$  produzido pelas PDCs pode funcionar como estimulador da expressão de maiores quantidades de TRAIL na membrana das PDCs, tornando insuficiente a quantidade de anticorpo bloqueador utilizado. Portanto, não ficou claro se as IKPDCs possuem efeito antiviral contra os monócitos através da expressão de TRAIL na membrana das PDCs.

A função do TRAIL presente na membrana das PDCs em induzir a apoptose das células infectadas não foi observada. Entretanto, era esperado que a diminuição do antígeno viral fosse consequência da apoptose das células infectadas, como para o DENV por Torrentes-Carvalho e col. (2009) e por Machmach e col. (2012) (80, 220). As IKPDCs migram para os tecidos linfóides proximais, onde não são a maioria das células, por isso usamos taxas efeto:alvo mais próximas ao que ocorreria nesse tecido. A função apoptótica das IKPDCs é apreciada em trabalhos com cocultura de IKPDCs e células T infectadas com HIV que utilizaram maiores números de PDCs para células alvo (275, 435, 457). A função apoptótica das IKPDCs dependeria também da expressão do receptor TRAIL-R nas células alvo e não observamos alterações marcantes no nosso estudo. Nos trabalhos de cocultura que apreciaram a função citotóxica das IKPDCs, foram utilizadas linhagens tumorais (217-219, 275, 457, 458) ou células alvo (435, 459, 460) que aumentam a expressão do receptor TRAIL-R. Assim, um dos requerimentos para a apoptose induzida via IKPDCs das células infectadas seria a modulação da expressão de TRAIL-R nas células alvo, o que não observamos em nosso sistema. Apesar disso, é necessário observar a modulação dos outros receptores de TRAIL na membrana das células alvo, pois a expressão do TRAIL-R não significa que o sinal apoptótico será transmitido. O TRAIL parece ser capaz de induzir a apoptose em algumas células infectadas com DENV. Por exemplo, Matsuda e col. (2005) mostram que hepatócitos expressam TRAIL-R2 e produzem TRAIL solúvel durante a infecção pelo DENV, sofrendo apoptose (461). Apenas um trabalho mostra a regulação de TRAIL-R pelo DENV2, em que a infecção de células endoteliais promove a diminuição da expressão desse receptor, sugerindo o escape da via do TRAIL (462). Um estudo detalhado da

expressão dos receptores de TRAIL e também de moléculas de sinalização apoptóticas, como o c-FLIP, poderia explicar se a replicação viral estaria bloqueando a apoptose no nosso sistema.

Nosso trabalho, não revelou uma intensa apoptose de monócitos infectados com DENV. O mesmo foi observado nos trabalhos de Warke e col. (2008) e Wong e col. (2012) (79, 117). Entretanto, a literatura aponta a apoptose de monócitos durante infecção *in vitro* pelo DENV2 (80, 463). Klomporn e col. (2011) observaram que a apoptose é induzida em linhagem monocítica U937 por todos os sorotipos do DENV, porém em cinéticas mais tardias (464). Arias e col. (2014) observaram a presença de células TUNEL+ em monócitos de pacientes em cultura após 5 dias (83). Nossa equipe relatou o aumento da apoptose em monócitos infectados com DENV2, dois dias após a infecção (80). A ausência de apoptose no modelo de infecção utilizado nesse trabalho, por Warke e col. (2008) e por Wong e col. (2012) pode ser explicada pela cinética precoce, mas principalmente pela interferência de outros tipos celulares durante a infecção *in vitro*. Talvez em pontos mais tardios (5 dias) a apoptose possa ser mais facilmente detectada. No modelo utilizado anteriormente por Torrentes-Carvalho e col. (2009) e pelo trabalho de Mosquera e col. 2005, os monócitos são enriquecidos por aderência o que não exclui a contaminação de outras populações celulares que podem contribuir para a apoptose das células infectadas. Nosso propósito nesse trabalho foi apenas verificar se as IKPDCs estariam induzindo ou não a morte das células infectadas e, portanto, não observamos apoptose, sugerindo que a ação antiviral das IKPDCs não é originada da redução por apoptose do número de células infectadas, embora isso deva ser melhor investigado.

Moléculas solúveis secretadas por IKPDCs apresentaram ação antiviral contra o DENV, assim como o IFN $\alpha$  solúvel, em monócitos humanos. De fato, os IFNs do tipo I possuem diversos mecanismos de inibição da replicação viral principalmente através da expressão dos ISGs. Nossos dados concordam com os dados de Kurane e col. (1990) que foram os primeiros a relatar o efeito antiviral dos interferons do tipo I em inibir a replicação viral nos monócitos humanos (122). Em seguida, Diamond e col. (2000) demonstraram em linhagens celulares monocíticas (THP-1, U937 e K562) que o pré-tratamento com IFN $\beta$  foi efetivo em bloquear a replicação viral (293). Crance e col. (2003) mostraram que o IFN $\alpha$  foi antiviral em linhagem HepG2 (465). Diamond e col. (2000) mostram que mesmo realizando a transfecção do RNA para

as células tratadas com IFN $\beta$ , não foi possível observar replicação viral, sugerindo que o IFN não estaria inibindo a entrada viral. Recentemente, foi demonstrado, em infecção de linhagens celulares, que o IFITM3 (ISG transmembranar expresso na membrana plasmática) é antiviral contra diversos vírus, dentre eles o DENV (466). Jiang e col. (2010) descreveram a função antiviral para as ISGs: IFITM3, IFITM2, ISG20, Viperina e PKR (467) contra replicação de WNV e DENV. De um modo geral, os flavivírus parecem ser eficientemente contra atacados pelos interferons do tipo I (292). Suportando essa hipótese, nós mostramos aqui seu efeito contra a replicação em monócitos humanos e também observamos seu efeito antiviral em MDDCs (dados não mostrados), assim como outros (448). O mecanismo da inibição da replicação do DENV pelos IFNs do tipo I em monócitos humanos pode ser mediado pela ativação da via do óxido nítrico. Em linhagens monocíticas, a replicação do DENV é inibida pelo óxido nítrico, que é ativado pela via dos IFNs do tipo I (468). Em conjunto aos nossos dados em pacientes, sugerimos a importância da via dos IFNs tipo I para o rápido clearance viral.

Usando um bloqueador do receptor de IFNs do tipo I em monócitos, observamos a importância dessa via para o bloqueio da replicação viral tanto dos IFN $\alpha$  produzido pela infecção dos monócitos pelo DENV2, quanto pelo IFN $\alpha$  produzido pelas PDCs. Confirmamos o envolvimento dos IFNs do tipo I na replicação viral, utilizando somente o sobrenadante das PDCs em monócitos infectados com a neutralização de IFNAR. Esses dados mostram que nesse sistema não somente o IFN $\alpha$ , mas o IFN $\beta$  podem ser determinante no bloqueio da replicação viral pelo DENV2. As PDCs produzem ambas as citocinas e observamos que somente o bloqueio do receptor foi capaz de interromper a ação antiviral dos sobrenadantes das PDCs e o efeito foi quase nulo quando neutralizamos apenas a citocina IFN $\alpha$ .

De fato, a ativação das PDCs foi fundamental contra replicação viral. Nós observamos uma variabilidade da replicação viral nos monócitos que é explicada pela variabilidade genética dos doadores e suportada por dados já descritos na literatura (81). De modo geral, a cocultura com IKPDCs foi capaz de inibir 50% da replicação viral e sugerimos que o equilíbrio entre o número de monócitos infectados durante a adsorção viral e a proteção dos monócitos não infectados exercida pelo IFN $\alpha$  produzido pelas IKPDCs foi determinante nesse caso.

De fato, diversos investigadores relatam que o DENV é capaz de inibir a sinalização da via dos IFNs do tipo I nas células infectadas (293, 469). Ainda, nós observamos em um trabalho comparativo entre a infecção de MDDCs com DENV e o vírus da febre amarela vacinal que a produção de IFN $\alpha$  foi superior durante a replicação do vírus vacinal (86), o que pode ser explicado pelo bloqueio da retroalimentação positiva da produção dos IFN do tipo I nas MDDCs infectadas com DENV (448). O DENV bloqueia a retroalimentação positiva da via dos IFNs do tipo I, interferindo na transdução de sinal dos IFNARs que levam a fosforilação de STAT1 e STAT2, que juntamente com IRF3 vão para o núcleo e iniciam a transcrição de diversos genes, como IFNs do tipo I. Em linhagens celulares, o complexo NS2A-NS4A-NS4B do DENV pode inibir a fosforilação de STAT1 (469), enquanto NS5 interfere com STAT2 (267, 470, 471). No caso das nossas coculturas, aparentemente, quanto menor a quantidade de células infectadas na adsorção viral, maior a capacidade inibitória do IFN $\alpha$ .

Observamos também que o IFN $\alpha$  pode ser responsável pelo aparecimento de populações de monócitos TRAIL+DENV- observados tanto durante as coculturas quanto durante a infecção viral. Sugerimos que a expressão de TRAIL nos monócitos possa ser um importante marcador ou até efetor da atividade antiviral do IFN $\alpha$  durante as culturas. Observou-se a ausência de população de monócitos antígeno viral positiva expressando TRAIL e que o bloqueio do IFNAR diminui a presença da população TRAIL positiva. Concordando com nossos resultados, Warke e col. (2008), em MDDCs, não observaram uma dupla população DENV+TRAIL+ e a infecção *in vitro* foi autolimitante. Nossos resultados apontam que provavelmente, o IFN $\alpha$  produzido de maneira autócrina durante a replicação viral pelos monócitos protege os monócitos não infectados, levando a redução do antígeno viral nos pontos mais tardios da cinética (79, 98). Em nosso sistema, sugerimos que o TRAIL na superfície dos monócitos poderia ser marcador da expressão dos ISGs nas populações não infectadas e, eventualmente ser antiviral para os monócitos não infectados. O IFN $\alpha$  produzido durante a replicação viral e não a detecção de partículas virais em si seria responsável pela expressão de TRAIL pelos monócitos. De fato, nossos resultados mostram que o tratamento com IFN $\alpha$  é capaz de induzir a expressão de TRAIL em monócitos. Griffiths e col. (1999) mostram que macrófagos tratados com interferons são citotóxicos para linhagens tumorais (226). Viladain e col. (2000) confirmam o papel dos IFNs tipo I em induzir a expressão de TRAIL em

DCs através do bloqueio da citocina no sobrenadante e também demonstram a expressão de TRAIL na superfície dos monócitos após tratamento com IFN $\alpha$  (472) e IFN $\beta$  (473). O IFN $\alpha$  produzido de maneira autócrina pelos monócitos infectados pode ser 1) originado do reconhecimento da infecção viral pelos PRRs citoplasmáticos; ou 2) originado do reconhecimento da partícula viral no endossomos pelos TLRs virais. Considerando que a via dos IFNs estaria bloqueada nos monócitos infectados, e, por conseguinte, a expressão de ISGs, a população TRAIL+DENV- sugere fortemente a proteção desses monócitos contra a infecção viral. Uma vez que o bloqueio do IFNAR tornou basal a detecção de TRAIL na membrana dos monócitos em cultura com o DENV, é mais provável que a expressão de TRAIL seja decorrente da estimulação por IFN $\alpha$  autócrino e não diretamente do reconhecimento da partícula viral pelos TLRs virais, por exemplo. Em PDCs, o TRAIL pode ser estimulado diretamente pela ativação de TLR7/9 sem a necessidade da sinalização IFNAR, ou pelos IFNs do tipo I (474). Em diversos sistemas, a infecção/estimulação viral com vírions ou suas proteínas foram capazes de aumentar a expressão do TRAIL nos monócitos: a replicação do vírus Ebola em macrófagos (475), a estimulação com hemaglutinina-neuroaminidase do vírus NDV em monócitos (476), a estimulação com HIV-1 AT2 em monócitos (446), a infecção de monócitos e DCs com vírus do sarampo (477). Assim, como o IFN $\alpha$ , o TRAIL pode ser produzido nas culturas infectadas. No caso do DENV, uma vez que ambos foram observados com funções antivirais independentes da apoptose, podemos sugerir que as IKPDCs estariam reduzindo a carga viral pela produção de IFN $\alpha$  primariamente. O TRAIL na superfície dos monócitos teria um papel secundário: 1) inibindo a replicação viral nos monócitos que não adsorveram a partícula viral; ou 2) sendo um marcador da ativação dos ISGs nesses monócitos não infectados.

## 5.2 As Células NK durante a infecção pelo vírus dengue

As células NK estão presentes no sangue periférico e a interação com partículas virais, citocinas solúveis, ou células infectadas pode levar a ativação dessas células, ou seja, ativar funções efetoras de citotoxicidade (expressão de TRAIL/FASL e liberação de granzimas) e de produção de citocina (IFN $\gamma$ ). As funções efetoras das células NK são fundamentais na imunidade antiviral, porque eliminam as células infectadas, colaborando para redução da carga viral. O processo de ativação das células NK pode variar de acordo com as subpopulações analisadas. As células NK CD56<sup>bright</sup> têm um perfil mais imunoregulador porque são rápidas

produtoras de citocinas, e recirculando para os órgãos linfoides, através da produção de IFN $\gamma$ , influenciam nas respostas de outras populações celulares. Apesar de não expressarem granzima e KIRs em altas concentrações, essa subpopulação pode ser citotóxica via TRAIL/FASL para células que expressam os receptores cognatos. As células CD56<sup>dim</sup> têm um perfil mais citotóxico, porque expressam perforina/granzina e os receptores KIR, reconhecem células alvo potenciais, podendo assim eliminar essas células através da expressão de TRAIL, FasL e granzimas/perforina (478).

Observamos um aumento na população total de células NK durante a fase aguda da FD, onde observamos maiores frequências nas duas populações analisadas para o grupo que apresenta as formas clínicas mais brandas da doença. Esses dados estão de acordo com o trabalho já publicado pela equipe do nosso laboratório (106). Azeredo e col. (2006) observaram que a frequência da população de células NK CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> em pacientes brandos é maior que controles saudáveis e pacientes graves, mostrando que a infecção pelo DENV tem impacto nos números das células NK totais na fase aguda. Uma diminuição degradativa na frequência desta população é observada com a progressão para convalescência. Ainda, o mesmo fato é observado para as populações de células CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, que incluem as células NKT. As células CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> exibem um aumento na frequência durante a fase aguda nos pacientes. Kurane e col. (1990) propõe que as células NK seriam fundamentais para o controle da infecção primária pelo DENV (122). Fadilah e col. (1999) observaram a leucopenia marcante nos casos de FHD em relação aos casos de FD, entretanto não foram observadas diferenças na frequência das células CD56<sup>+</sup> (479). Concordando com nossos dados de frequência da população das células NK, Green e col. (1999) descrevem maior frequência de células CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> em crianças com quadros de FD em relação a FHD (123). De modo similar, Wahid e col. (2000) descreve menor frequência de células CD56<sup>+</sup> no sangue periférico de casos de FHD (124). Entretanto, Tsai e col. (2011) observam que a população de células NK flutua de acordo com o dia da doença. Além disso, foi observado neste trabalho uma menor frequência de células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, discordando dos nossos resultados. Entretanto as células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> foram detectadas em maiores frequências que os controles saudáveis (430). De um modo geral, podemos sugerir que em pacientes brasileiros, a infecção pelo DENV tem impacto positivo na frequência da população de células NK totais. Ainda, durante a vacinação de voluntários contra febre amarela, observou-se o aumento da frequência de células

CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> sete dias após a vacinação (480). Esses dados em conjunto sugerem a capacidade dos flavivírus em interferir na frequência das células NK durante a fase aguda da doença.

A manutenção do número de células NK funcionais é crucial para a defesa antiviral. Por exemplo, em indivíduos infectados com EBV, observa-se uma expansão da população de células NK no sangue periférico durante a fase inicial da doença que retorna a níveis basais uma vez que a imunidade adaptativa é iniciada (481). Pouco se sabe sobre a meia-vida das células NK na circulação. No caso, o aumento das populações estudadas pode ser explicado pela maior produção de precursores de células NK pela medula óssea, ou pela redistribuição das populações dos tecidos para os órgãos linfáticos. Outra possível explicação seria a expansão na periferia das células NK. Lutz e col. 2011 observaram que a população CD56<sup>bright</sup> expande-se rapidamente e tem maior tempo de vida que a CD56<sup>dim</sup> (482). Diversos autores descrevem que as CD56<sup>bright</sup> podem ser precursoras de parte das células CD56<sup>dim</sup> no sangue periférico (367). A expansão de células NK não necessita de pré-ativação das subpopulações, podendo ser estimulada pelos diversos fatores solúveis presentes durante a infecção viral, como por exemplo a IL15 que possui funções de proliferação (334) e sobrevivência (335). De fato, Azeredo e col. (2006) observaram elevados níveis de IL15 durante a fase aguda da dengue, correlacionando positivamente com a frequência das células NK totais encontradas nos pacientes (106). Desse modo, acreditamos que a expansão das subpopulações de células NK possa ser indicativa de seu papel protetor na imunopatogenia da dengue.

O papel efetor das células NK na imunopatogenia da dengue não é completamente esclarecido. Sabe-se que os números de células NK não representam necessariamente a sua função efetora, como observado para indivíduos idosos (481). Assim, estudamos o fenótipo efetor das células NK durante a infecção natural pelo DENV em pacientes sintomáticos na fase aguda, analisando a ativação na população CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> que seria mais próxima fenotipicamente a população CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> com características citotóxicas. A população CD16<sup>-</sup> não foi analisada, porque não foi possível obter um número suficiente de células de pacientes para essa população. As células NK apresentaram maior expressão de TRAIL na superfície celular nas amostras de pacientes mais brandos. O marcador de citotoxicidade CD107a e ativação TLR3 estavam aumentados em relação aos controles saudáveis. Nossos dados confirmam os resultados encontrados

anteriormente por Azeredo e col. (2006) que apresentam maiores níveis de ativação pela expressão de CD69 e detecção do grânulo citotóxico TIA1 nesse grupo de pacientes (106). Esses dados indicam que a ativação das células NK teria papel no bom prognóstico da doença.

Entretanto, o perfil de ativação de células NK em pacientes com FD mostra resultados contraditórios na literatura. Alguns sugerem que a ativação de células NK nos casos graves poderia estar correlacionada com a hepatomegalia e danos ao fígado observados nos casos mais graves. Em crianças, que o marcador de ativação CD69 expresso em células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> foi correlacionado com os casos de FHD (123) e com casos de choque (125). A citotoxicidade *in vitro* mediada por anticorpos de pacientes com FHD foi mais intensa quando comparada a mediada por anticorpos dos casos mais brandos, sugerindo que a função citotóxica aumentada contribuiria para a gravidade da doença (415). Em modelos murinos de infecção pelo DENV, observou-se que a replicação viral no fígado é determinante para o recrutamento de células NK em mecanismo dependente de CXCL10 e o infiltrado hepático de células NK correlaciona com a apoptose observada nas células do fígado (483).

Assim como propomos, outros grupos sugerem que a ativação das células NK teria papel fundamental na rápida eliminação da carga viral. Em um primeiro trabalho, Homchampa e col. (1988) mostram que o marcador HNK1, expresso em 60% das células NK ativadas, tinha frequência diminuída nos casos de FHD grau III em relação ao casos de grau II (484). Wahid e col. (2000) não observaram uma associação entre as lesões hepáticas e os números de células NK em pacientes com FHD (124). Em modelo murino, a expressão de CD69 em células NK, sugere a ativação transiente destas propondo seu papel importante do controle da carga viral (485). Recentemente, Guabiraba e col. (2013) observaram que camundongos IL22<sup>-/-</sup> infectados com DENV exibem lesão hepática intensa. Nesse modelo, as células NK hepáticas foram as principais produtoras de IL22 nos camundongos WT, em que se atribuiu um papel anti-apoptótico a citocina, sugerindo uma função imunoreguladora às células NK (486). Suportando um papel protetor da ativação de células NK no prognóstico da dengue, estudos de expressão gênica apontam menor abundância de transcritos relacionados a função efetora de células NK em pacientes com quadros de choque (416). Recentemente, Sun e col. (2013) identificaram 7 genes preditivos de FD em detrimento à FHD e dentre eles a molécula CD244 ou 2B4,

relacionada a ativação da citotoxicidade nas células NK foi uma das relacionadas (417).

Em nosso trabalho, analisando a função citotóxica, foi possível observar que a expressão do TRAIL membranar nessas células teve um maior poder discriminatório que o marcador de citotoxicidade CD107a (indicador de degranulação) entre os grupos de pacientes analisados. Embora diversos trabalhos em outras infecções sugerem uma relação fundamental da citotoxicidade via TRAIL e a redução da carga viral, este é, no nosso conhecimento, o primeiro relato da expressão de TRAIL em células NK para DENV. Pacientes crônicos HCV mostram que, após tratamento com IFN $\alpha$  peguilado, foi observada uma queda na carga viral correlacionada com o aumento da expressão de TRAIL nas células NK (351). Ainda, em casos de infecção aguda acidental com pequenas inóculos de HCV foi observada a rápida ativação de células NK, com expressão de TRAIL e CD107a, nos casos que apresentaram baixa viremia e ausência de comprometimento sistêmico (411). A citotoxicidade via TRAIL de células TCD8 específicas para WNV foi determinante para redução da carga viral em cérebros de camundongos TRAIL<sup>-/-</sup> (243). Em modelo murino, células NK TRAIL<sup>+</sup> foram encontradas no pulmão com infecção ativa por influenza e o bloqueio da via do TRAIL retardou o clearance viral (487). Esses dados sustentam o papel do TRAIL na membrana de células NK e sua possível relação com a citotoxicidade.

A citotoxicidade via perforina/granzima pode ser estimada em células NK através da marcação extracelular de CD107a, proteína do compartimento lisossomal, que passa a ser expressa na membrana plasmática após a efetiva degranulação dos grânulos citolíticos (426). Esse marcador fornece uma aproximação das células NK que liberaram perforina/granzima, mas também das células NK que liberaram citocinas. Além disso, foi observado recentemente que a expressão de CD107a 1) é obrigatória para liberação dos grânulos citotóxicos (488) e 2) protege as células NK contra a sua própria citotoxicidade (489). Encontramos maior expressão de CD107a em todos os quadros clínicos observados em relação aos controles saudáveis, porém não observamos diferenças marcantes na expressão entre os grupos com doença. Esses dados sugerem que a citotoxicidade via perforina/granzima estaria ativa durante a infecção pelo DENV, podendo participar na imunopatogenia. Em outras infecções, foi observada a expressão de CD107a correlacionando sua presença com o estado ativado dessas células: durante infecção por HCV (490), infecção ativa pulmonar por influenza (491) ou em

pacientes HIV (492). Nosso grupo observou que em pacientes com Dengue, as células TCD4 e TCD8 expressam o marcador CD107a nos pacientes independente da gravidade (493), assim como observamos nesse estudo. Desse modo, podemos sugerir que a citotoxicidade via perforina/granzima das células NK demonstra a ativação das células NK durante a infecção pelo DENV.

As células NK podem expressar PRRs virais específicos, como TLR3 e TLR9 (310). Apesar de dsRNA ter sido descrito como ligante de TLR3, diversos intermediários da replicação de vírus ssRNA ou da transcrição bidirecional de vírus de dsDNA ativar TLR3 como WNV (ssRNA), HSV (dsDNA) e também o DENV (494). Em nosso trabalho, observamos a expressão de TLR3 nas células NK dos pacientes na fase aguda da dengue. Schmidt e col. (2004) observaram que o RNAm do TLR3 é expresso de maneira similar nas populações de células NK e DCs em PBMCs humanas e a administração *in vitro* de poli I:C (agonista TLR3) induziu ao aumento de sua expressão (495). A ativação de TLR3 *in vitro* leva a expressão de marcador de ativação como o CD69, sugerindo a importância do reconhecimento pelos TLRs virais na ativação das populações de células NK. Além disso, células NK TLR3<sup>bright</sup> foram mais citotóxicas que as TLR3<sup>dim</sup> (496). A estimulação via TLR3 foi cofator para a citotoxicidade das células NK contra DCs imaturas (497). Em nossos dados, as células NK totais dos pacientes exibiram um aumento significativo na expressão de TLR3 não discriminante entre os quadros clínicos, o que pode refletir o reduzido número de pacientes nessa análise. Talvez o aumento da expressão de TLR3 seria um indicativo da ativação dessas populações celulares. De fato, em indivíduos recém-vacinados contra febre amarela, observou-se o aumento da expressão de TLR3 e TLR9 em células NK totais, que foi correlacionado positivamente com o marcador de maturação CD69 (480). Esses dados em conjunto reforçam o papel das células NK ativadas no controle precoce da replicação viral.

Não somente a presença da célula alvo, mas também a ativação por fatores solúveis podem ser apreciados para as células NK. Descrevemos a presença de citocinas ativadoras das células NK, como IFN $\alpha$ , IL12 (neste trabalho) e IL15 (106). De maneira geral, as citocinas foram encontradas mais elevadas nos casos mais brandos da doença, suportando o papel efetivo das células NKs ativadas no bom prognóstico da doença. O papel da IL12 ainda é discutido na literatura. De fato, Pasca e col. (2000) relatam níveis elevados de IL12 em pacientes com FD em comparação a quadros de FHD (111). Entretanto, recentemente não foi encontrada

uma associação significativa com a gravidade quando a nova classificação da OMS (2009) foi utilizada (498). A IL12 tem papel fundamental na geração de um perfil de resposta Th1 e alguns autores sugerem que a gravidade da doença está relacionada com uma troca no perfil de resposta para Th2. Nas células NK, esta citocina é um cofator para a produção de IFN $\gamma$ , como observado para combinações IL12+IL2 (353, 354), IL12+IL18 (355, 356), IL12+IL15 (355), IL15+IL18 (357), IFN $\alpha$ +IL12 (356), IFN $\alpha$ +IL18 (356). Entretanto, nossa equipe já observou que a produção excessiva de IFN $\gamma$  foi correlacionada com a gravidade (110), sendo que as células NK podem ser as principais produtoras desta citocinas durante estimulação *in vitro* pelo DENV (499). Apesar disso, as células T também são responsáveis pela produção de IFN $\gamma$  e um perfil produtor de citocinas em detrimento ao perfil citotóxico dessas células foi associado com casos graves da doença (64). Uma publicação recente descreve que a IL12 sozinha pode ser responsável pela citotoxicidade via TRAIL das duas subpopulações NK de células estudadas (500). Desse modo, a IL12 teria diversos papéis na função efetora das células NK que podem levar tanto a ativação da citotoxicidade quanto a produção de IFN $\gamma$ .

Em conjunto, nossos dados em pacientes indicam que as células NK teriam papel no prognóstico da doença. Estudo de polimorfismo na população brasileira encontrou diferenças nos genes de KIRs (reguladores da citotoxicidade), associando-os a presença de doença (501). Os genes MICA e MICB (ligantes de ativadores da citotoxicidade) também foram estudados em pacientes cubanos e alguns haplótipos foram associados a doença (502). Esses dados suportam fortemente o envolvimento das células NK no prognóstico da doença. Assim, nossos dados em pacientes sugerem que a ativação dessas células pode ser um bom prognóstico para a ocorrência de infecções brandas.

A estimulação de DENV-2 pode alterar a frequência das células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> sutilmente, sem alterar a frequência das células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Uma das possíveis explicações envolveria a ativação indireta dessas células, por exemplo, por citocinas produzidas por outros tipos celulares. As células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> tem alta expressão de receptores de citocinas, como por exemplo, o receptor de alta afinidade para IL2 (330, 331). Outra citocina que pode interferir na expansão das células NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> é a IL15 (334), porém não detectamos níveis desta citocina durante a estimulação viral em PBMCs. O significativo, porém pequeno, aumento de frequência desta população sugere que o vírus está direta ou

indiretamente ativando esta população. Podemos especular que a estimulação com as partículas virais poderia interferir na ativação dessas células, induzindo a expansão dessa subpopulação de células NK.

Observamos que as duas subpopulações de células NK são capazes de expressar TRAIL membranar, porém não observamos a expressão diferencial do marcador de degranulação CD107a. Esses dados sugerem que dois mecanismos diferenciais de ativação da citotoxicidade ocorreriam durante a estimulação viral. A degranulação requer um somatório de sinais inibitórios e ativadores provenientes das células infectadas. Durante o nosso modelo de estudo *in vitro* foi possível observar a presença de antígenos virais nos monócitos infectados (dados não mostrados). Porém, a expressão de CD107a nas células NK dos pacientes sugere que as células NK degranulariam durante a infecção natural. Nosso sistema de detecção da citotoxicidade de perforina/granzima pela avaliação da expressão de CD107a não foi efetivo em observar diferenças significantes, mas levanta a hipótese de que o DENV não seria um bom indutor da degranulação *in vitro* contra os monócitos infectados. De fato, Garcia e col. (2006) mostram a necessidade de anticorpos específicos anti-dengue para a citotoxicidade via ADCC de linhagem monocítica infectada com DENV (415). Ainda, Hershkovitz e col. observam o aumento da expressão de MHC de classe I em linhagens monocíticas, expressando proteínas virais do DENV, observando também o aumento da ligação de KIRs inibitórios das células NK em cocultura (126, 127). Outros flavivírus também podem alterar a expressão de MHC de classe I em células infectadas (118). Comparando esses resultados com nossos dados *in vitro*, podemos supor que a citotoxicidade observada nas células NK dos pacientes seria reflexo de sua ativação em outros compartimentos corporais, como por exemplo no tecido hepático. Desse modo, não ficou claro se a estimulação *in vitro* pelo DENV é capaz de induzir ou não a degranulação das células NK em cultura.

Sabe-se que as células NK durante a infecção viral podem ser ativadas indiretamente pela produção de citocinas ou diretamente pelo reconhecimento das partículas virais (503). Em nosso modelo, não foi possível observar se as partículas virais seriam reconhecidas diretamente pelas células NK, entretanto, a literatura relata que o receptor natural de citotoxicidade NKp44 é capaz de reconhecer as proteína envelope do DENV (504). Os receptores TLR virais poderiam também mediar o reconhecimento direto das partículas virais. O TLR3 pode reconhecer as

formas replicativas do genoma do DENV (75), porém nada se sabe sobre a sua função nas células NK durante a infecção. A ativação das células NK via TLRs leva a produção de IFN $\gamma$  e expressão de CD69, como citado anteriormente. Por exemplo, em modelo *in vitro* de estimulação de células NK purificadas, o bloqueio do receptor TLR2 inibiu a produção de IFN $\gamma$  mediante estimulação direta com as partículas virais (505). Além disso, a ativação das células NK pode levar ao aumento da expressão de TLR3, como observado num sistema *in vitro* de estimulação com vírus da encefalite equina (506). Observamos que no modelo *in vitro* estudado aqui, as células CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ CD16 $^{-}$  apresentaram um pequeno, porém significativo aumento na expressão de TLR3. Talvez a expressão de TLR3 nessa subpopulação seja resultado da sua modulação por citocinas presentes no sobrenadante das PBMCs estimuladas, uma vez que essa população estudada teria um perfil mais imunoregulatório. Outra possibilidade é que o aumento da expressão de TLR3 represente o reconhecimento pelo DENV desse receptor e consequente a sua retroalimentação positiva. Observamos que o aumento de TLR3 foi mais evidente nas células NK totais dos pacientes, o que sugere que outros fatores solúveis não presentes no nosso sistema *in vitro* possam regular a expressão de TLR3. Outra explicação plausível seria que o aumento do TLR3 seria mais evidente tardiamente.

A expressão de TRAIL nas células NK em cultura com DENV2 foi observada nas duas subpopulações celulares estudadas, de maneira precoce e dose viral dependente. Esses dados confirmam os resultados encontrados em pacientes, mostrando que a infecção pelo DENV2 é capaz de regular a expressão de TRAIL nas células NK, ou seja, a sua citotoxicidade por essa via. Diversos trabalhos demonstram que a expressão de TRAIL na membrana das células NK *in vitro* é traduzida em citotoxicidade efetora contra células alvo tumorais infectadas ou não (351, 507, 508). Desse modo, a expressão de TRAIL nas células NK pode indicar o fenótipo ativado dessas células. Ainda não se conhece se a função citotóxica do TRAIL nas células NK teria papel efetivo em reduzir a carga viral pelo DENV *in vitro*. Sabe-se que o ligante do TLR3 poli I:C é capaz de induzir uma pequena expressão de TRAIL em culturas de células NK purificadas (234), sugerindo que partículas virais também poderiam estimular diretamente a exposição de TRAIL.

Uma vez que nesse sistema não é possível determinar a influência direta das partículas virais na ativação das células NK, estudamos a possível ativação indireta por fatores solúveis presentes nas culturas. Como já discutido acima, a IL12 pode

induzir TRAIL e também a liberação de IFN $\gamma$  pelas células NK. Observamos que a IL12 foi produzida de maneira dose viral dependente. Uma vez que encontramos monócitos infectados nas culturas, podemos sugerir que a IL12 detectada seja produzida pelas células monocíticas. A existência de IL12 nas culturas suporta a ativação das células NK durante a estimulação com DENV, uma vez que a IL12 é importante cofator para produção de IFN $\gamma$  e foram detectados níveis significativos de IFN $\gamma$  durante estimulação viral pelo DENV (499). Não foi possível observar a presença de IL15 no sobrenadante das culturas infectadas. A IL15 é uma citocina que pode ser apresentada pelas MDCs durante a sinapse regulatória com as células NK. Já observamos que durante a infecção *in vitro* de monócitos humanos, níveis muito baixos foram detectados nos sobrenadantes das culturas (81). A IL15 é capaz de induzir a expressão de TRAIL em células NK (336), além de exercer papel na proliferação e sobrevivência dessas células. A ausência da citocina sugere a princípio o seu não envolvimento com a exposição de TRAIL na membrana das células NK.

O IFN $\alpha$  foi encontrado de maneira dose viral dependente nas culturas de PBMCs estimuladas com DENV2. Conforme discutimos na seção anterior, as PDCs nesse sistema *in vitro* são as principais produtoras da citocina durante a estimulação viral. Sato e col. (2001) observaram que as células NK estimuladas com IFN $\alpha$  passam a expressar TRAIL que é funcionalmente citotóxico contra células infectadas (350).

Estudamos então os efeitos do IFN $\alpha$  na ativação das células NK durante a infecção pelo DENV. O IFN $\alpha$  pode induzir a proliferação das células NK através da produção de IL15 (349), o que explicaria a população CD3-CD56+CD16- aparecendo com maior frequência. Entretanto, não observamos a produção de IL15 durante a estimulação viral. Uma possível explicação para a alteração nas frequências seria o aumento seletivo de outras populações de células NK que não foram analisadas. De maneira interessante, Shimoda e col. (2013) estudando a resposta de células NK de pacientes HCV positivos observa a mesma alteração de frequência que observamos quando são administrados IFN $\alpha$  e LPS à cultura (509). Talvez as células NK CD56+CD16+ passem a um fenótipo mais ativado e citotóxico (510), perdendo a expressão de CD56 e alterando a frequência na cultura. O aumento de frequência das células CD56+CD16- pode refletir a alta responsividade dessa subpopulação às citocinas presentes na cultura. De fato, durante o tratamento

de pacientes HCV com IFN $\alpha$  peguado observou-se um aumento na frequência de células NK CD56<sup>+/bright</sup>CD16<sup>-</sup> (511, 512), sugerindo que a subpopulação responde com proliferação a estimulação com IFN $\alpha$ . Desse modo, a alteração de frequência observada para essa população pode ser consequência dos níveis de IFN $\alpha$  presentes nas culturas de células NK estimuladas com DENV2.

As PDCs são grandes produtoras de IFN $\alpha$ , que é indutor de TRAIL em diversos tipos celulares durante a estimulação de PBMCs (513). O DENV2 foi capaz de induzir maiores níveis de TRAIL em todas as populações descritas sendo que os níveis de TRAIL observados foram maiores nas células CD3-CD56+CD16-, que seriam fenotipicamente mais próximas as células CD56<sup>bright</sup>. Esses resultados foram também observados por Nielsen e col. (2012) que demonstram a maior expressão de TRAIL nas células NK CD56<sup>bright</sup> em comparação as CD56<sup>dim</sup> (366), que pode ser reflexo dos diferentes mecanismos de citotoxicidade exercidos pelas diferentes populações de células NK. As células CD56<sup>bright</sup> apresentam nível baixíssimos de perforina e o mecanismo de citotoxicidade destas é dependente de TRAIL.

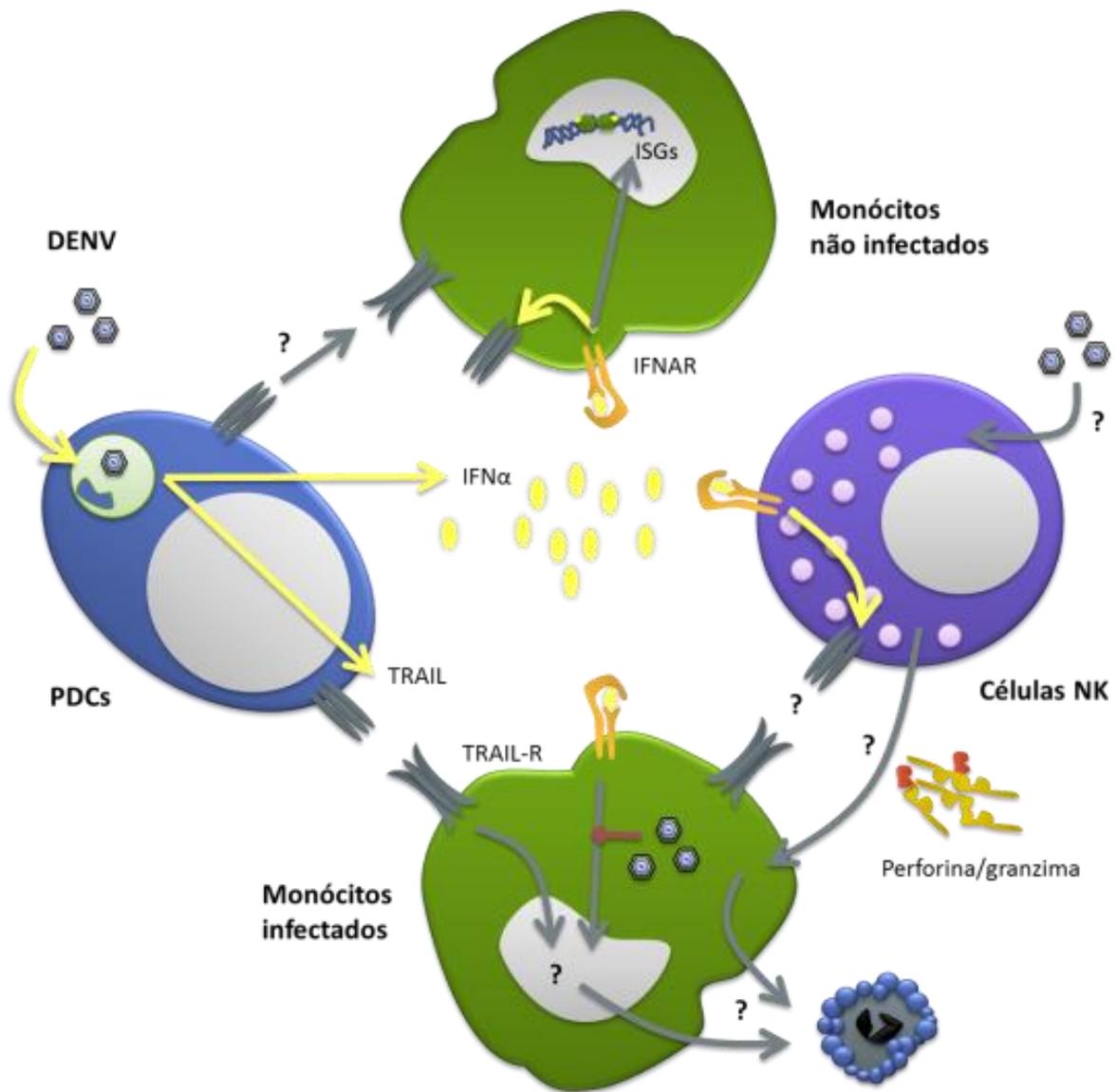
Apesar de não ser o mecanismo principal de citotoxicidade, as células CD56+CD16-(mais próxima as CD56<sup>dim</sup>) expressam TRAIL em nosso sistema. A expressão diferencial de TRAIL para as duas subpopulações estudadas pode refletir as diferenças funcionais e migratórias dessas células. Por exemplo, as células NK CD56<sup>bright</sup> estão mais presentes nos órgãos secundários, onde exercem funções imunoregulatórias através da produção de citocinas (302). A expressão de TRAIL pode ser fundamental em induzir a apoptose de células imunológicas superativadas ou infectadas, auxiliando na diminuição da resposta inflamatória e no clearance viral. Uma vez que durante a infecção pelo DENV, as principais células infectadas, os fagócitos mononucleares, teoricamente migrariam para os órgãos periféricos, a presença de células NK TRAIL+ pode auxiliar na eliminação de células apresentadoras de antígenos infectadas, selecionando APCs que apresentariam eficientemente os antígenos virais. Observamos que essa subpopulação responde exuberantemente a estimulação com IFN $\alpha$  recombinante, porém não foi possível bloquear totalmente sua ação pelo uso do anticorpo neutralizante do receptor. Provavelmente níveis baixos de IFN $\alpha$  seriam suficientes para ativar a subpopulação CD56<sup>bright</sup>. Correlacionando com o sutil aumento de expressão de TLR3, esse subtipo poderia ser mais eficiente em reconhecer as partículas virais e passar a expressar o TRAIL na membrana. A colocalização das PDCs com as células NK nos

linfonodos, por exemplo, pode ser fundamental para o sinergismo da expressão de TRAIL nas células NK.

No caso das células CD56<sup>dim</sup>, analisadas como CD56+CD16+, a expressão de TRAIL pode ser um dos mecanismos de sua ativação e, em nosso sistema, demonstrou maior dependência da sinalização IFN $\alpha$  que a outra subpopulação de NK estudada. A maior densidade de CD56<sup>dim</sup> nos tecidos não linfoides periféricos (367) sugere a importância dessas células para efetivo clearance viral nos órgãos e sangue periférico. Uma vez que o TRAIL também é antiviral para o DENV (117), não sabemos se o TRAIL na superfície das células NK exerceria também essa função. A literatura descreve que a IL15 e o IFN $\gamma$  também podem induzir a expressão de TRAIL nas células NK (513), entretanto não detectamos IL15 e não foi possível analisar IFN $\gamma$ , e assim, não podemos excluir os possíveis efeitos da ativação indireta dos subtipos de células NK por essas citocinas.

Observamos que o IFN $\alpha$  exerce a maior parte do sinal inicial de indução da expressão de TRAIL nas células NK, fato descrito por Sato e col. (2001) (350). Durante as culturas de PBMCs com DENV2, observamos que quanto maiores os níveis de IFN $\alpha$  no sobrenadante, menor a detecção de antígenos virais nos monócitos (dados não mostrados). A princípio o IFN $\alpha$  produzido pelas PDCs poderia proteger os monócitos na cultura de PBMCs não infectados de subsequente replicação viral, porém, o mesmo IFN $\alpha$  poderia participar na ativação das células NK, auxiliando na eliminação das células já infectadas.

Desse modo, através de diversos marcadores observamos que as células NK teriam um perfil ativado (TRAIL – CD107a – TLR3) nos casos mais brandos de Dengue, fato que pode ser correlacionado com a ativação de PDCs (TRAIL) e com a detecção de níveis de IFN $\alpha$ . Entretanto, observamos que *in vitro* a ativação da citotoxicidade foi menos evidente que as células NK *in vivo*. Modelos para a análise direta da degranulação das células efetoras explicariam melhor um possível escape viral nos monócitos humanos (células alvo). Nossos dados, entretanto, sugerem que as células NK estariam ativadas durante a infecção natural e que a ativação *in vitro* seria mediada por mecanismo indiretos, como a produção de fatores solúveis.



**Figura 5.1: Interação entre PDCs e células NK durante a infecção pelo DENV.**

Durante a infecção pelo DENV, as PDCs reconheceriam os vírus circulantes, liberando IFNs do tipo I e expressando TRAIL. Nos monócitos não infectados, os IFNs do tipo I induziriam a expressão de diversos genes estimulados por interferons (ISGs) e também TRAIL na superfície, ativando diversos mecanismos antivirais que inibiriam a futura replicação do DENV nessas células. Nos monócitos infectados, mesmo que a infecção propicie a produção de citocinas antivirais, as vias induzidas pela sinalização dos IFNAR estariam bloqueadas. Não se sabe se a sinalização do TRAIL também estaria bloqueada nessas células. Os IFNs do tipo I estimulariam a expressão de TRAIL e a citotoxicidade das células NK que poderiam eliminar os monócitos infectados. Não se sabe se as células NK poderiam reconhecer diretamente as partículas virais. A rápida ativação das PDCs e das células NK poderia colaborar para a eliminação do vírus, um dos mecanismos para reestabelecer a homeostasia. As setas representam evidências mostradas nesse trabalho (amarelo), fatos descritos na literatura (vermelho) ou questionamentos (cinza).

Nesse contexto podemos sugerir que o eixo PDCs – IFN $\alpha$  – TRAIL – Células NK seriam parte importante da imunidade inata durante a infecção pelo DENV (Figura 5.1). A capacidade de reconhecimento rápido da infecção viral pelas PDCs poderia induzir a uma robusta e rápida liberação de IFN $\alpha$  na corrente sanguínea, que além de proteger as células alvo da infecção, promoveria a defesa citotóxica das células NK contra as células infectadas. Nesse contexto, o escape viral atuando na

inibição da ativação das PDCs e das células NK, poderia propiciar a rápida replicação viral e elevada carga viral que seriam responsáveis pela intensa ativação da resposta inflamatória e levando eventualmente ao choque hipovolêmico. Apesar de restarem muitas dúvidas sobre seu funcionamento, descrevemos aqui uma pequena parte de um possível mecanismo antiviral da imunologia inata durante a infecção pelo DENV que pode ser explorado para o desenvolvimento de novas drogas ou outras intervenções.

## 6 Conclusões

---

Nesse estudo observamos características relacionadas a indução da resposta imunológica inata, tendo como objetos de estudo duas populações celulares – células dendríticas plasmacitoides e células NK - fundamentais para a rápida resposta efetora a infecções virais, usando como modelo a infecção *in vitro* pelo DENV. A função efetora das células foi investigada baseando-se em diversos marcadores e de citocinas solúveis, tendo como moléculas centrais a citocina antiviral IFN $\alpha$  e o seu elemento de resposta TRAIL. Descrevemos, assim, os seguintes fatos:

- As PDCs dos pacientes com DENV não apresentaram frequências diferentes (em PBMCs) das PDCs dos doadores saudáveis, porém foram observados maiores números de PDCs TRAIL positivas, ou maior ativação, nos pacientes com DENV, destacando-se nos casos mais brandos de DENV.
- A citocina IFN $\alpha$  foi detectada em níveis elevados nos casos mais brandos de infecção pelo DENV, enquanto os níveis dos casos mais graves parecem ser basais ou similares aos detectados nos controles normais. Foi possível calcular uma correlação positiva entre os níveis da citocina e a porcentagem de PDCs TRAIL positivas, sugerindo que a ativação das PDCs seria maior nos casos mais brandos.
- O TRAIL solúvel foi observado em níveis elevados nos casos mais brandos de infecção pelo DENV. Os mesmos níveis foram observados nos controles saudáveis e nos casos mais graves. O TRAIL solúvel e o TRAIL membranar nas PDCs foram positivamente correlacionados, sugerindo mais uma vez que as PDCs estariam mais ativadas nos casos mais brandos.
- A ativação das PDCs (purificadas ou não) através da expressão de TRAIL *in vitro* não foi possível utilizando o sobrenadante de culturas de linhagem celular de mosquito infectadas com DENV2.
- A técnica de concentração viral utilizada mostrou-se mais efetiva em na replicação em linhagem celular de mosquito.
- A ativação das PDCs (purificadas ou não) através da expressão de TRAIL e produção de IFN $\alpha$  mostrou-se efetiva quando o vírus ultracentrifugado foi utilizado e de maneira dose viral dependente.

- A via endossomal de reconhecimento é necessária para a ativação das PDCs durante a estimulação viral, uma vez que o uso da cloroquina propicia o bloqueio da exposição membranar de TRAIL e a degradação de partículas virais intracelulares.
- As PDCs não exibem antígenos virais intracelulares em comparação aos monócitos humanos, reforçando o fato que as partículas virais são completamente degradadas e que as PDCs não replicam eficientemente o DENV. A expressão de TRAIL nas PDCs não depende da fusão viral das partículas infecciosas com o sistema de membranas das PDCs.
- As IKPDCs (ativadas por CpG) foram antivirais quando cocultivadas com monócitos após a adsorção viral. A cloroquina bloqueia esse efeito antiviral mostrando a necessidade do reconhecimento endossomal para a ação efetora antiviral das PDCs.
- As IKPDCs a princípio não parecem exercer a função antiviral através da indução da apoptose das células infectadas pela via do TRAIL. Apesar disso, o TRAIL solúvel recombinante é antiviral quando administrado antes da adsorção viral, o que não exclui sua função antiviral no sistema de coculturas.
- As IKPDCs parecem exercer a função antiviral através da produção de IFN $\alpha$ , que, durante as coculturas, foi encontrado em elevados níveis nas condições em que as PDCs encontravam-se ativadas.
- A função antiviral das PDCs não parece depender de TRAIL membranar e é independente do tempo de incubação observado das coculturas.
- Os monócitos que expressam o antígeno viral não apresentam a expressão membranar de TRAIL e vice-versa, sugerindo que o mecanismo antiviral esteja inter-relacionado a ativação da via do TRAIL nessas células.
- O bloqueio dos receptores IFNAR recupera a detecção dos antígenos virais nos monócitos tanto durante as coculturas quanto durante a infecção sem a presença das PDCs.
- O bloqueio do IFNAR também inibe a expressão de TRAIL nos monócitos durante as coculturas, sugerindo que o IFN $\alpha/\beta$  poderia ativar a via do TRAIL e que ambas as citocinas seriam efetoras antivirais durante a infecção.
- As células NK CD56+CD16+/- tem frequência alterada (aumento) durante a infecção pelo DENV, sugerindo o envolvimento desse compartimento celular nas formas clínicas brandas da doença.

- Maior porcentagem de células NK CD3-CD56+CD16+TRAIL+ foram encontradas nos casos mais brandos de DENV, sugerindo o envolvimento da ativação das células NK na evolução das formas clínicas da doença.
- A degranulação das células NK CD3-CD56+CD16+, medida pelo marcador extracelular CD107a, foi observada em todos os quadros clínicos, corroborando a ativação das células NK durante os quadros de doença.
- A expressão de TLR3 foi encontrada aumentada nas células NK totais (CD3-CD56+) nos quadros brandos da doença sugerindo seu envolvimento na imunidade inata durante a infecção pelo DENV.
- Assim como IFN $\alpha$  e TRAIL, observamos níveis de IL12 diferencialmente detectados nos casos brandos da doença, o que pode explicar a ativação das células NK nesses casos, uma vez que todas as citocinas citadas colaboram para o aumento da citotoxicidade dessa população celular.
- O DENV foi capaz de *in vitro* alterar a frequência (aumento) de células NK CD3-CD56+CD16-, mas não de células CD3-CD56+CD16+, sugerindo que a regulação da proliferação, expansão ou morte dessas células pode depender de outros fatores não presentes durante as culturas *in vitro*.
- As células NK exibem TRAIL após estimulação viral com DENV2 *in vitro* de maneira dose viral dependente.
- As células NK não exibem o marcador de degranulação CD107a durante a estimulação *in vitro*, sugerindo que outros fatores relacionados a células alvo seriam necessários para a citotoxicidade *in vitro*.
- A expressão de TLR3 nas células NK CD3-CD56+CD16- exibe pequeno aumento, sugerindo que essa subpopulação estaria sendo positivamente regulada pela estimulação viral.
- As citocinas estimuladoras das células NK, IL12 e IFN $\alpha$ , foram produzidas durante a estimulação viral, de maneira dose dependente, sugerindo que a ativação das células NK também seria decorrente de estimulação indireta por fatores solúveis.
- A administração de IFN $\alpha$  recombinante mostra efeito similar na expressão de TRAIL de células NK, porém não se observa o mesmo efeito nas PDCs, sugerindo que as vias de ativação do TRAIL seriam distintas nas duas populações celulares estudadas. Para as células NK, o efeito do IFN $\alpha$  foi sempre menor que a estimulação viral, mesmo quando a citocina é detectada em níveis

maiores. Encontramos uma correlação positiva entre a expressão de TRAIL nas duas populações de células NK e dos níveis de IFN $\alpha$  nas culturas.

- O bloqueio do IFNAR nas células NK mostra que as células NK CD3-CD56+CD16- são menos dependentes da sinalização de IFN $\alpha$  para expressar o TRAIL que células CD3-CD56+CD16+, reforçando o papel diferencial das duas subpopulações estudadas.
- A expressão de TRAIL nas células NK CD3-CD56+CD16- foi maior que nas células CD3-CD56+CD16+, sugerindo que a função efetora dependente de TRAIL seria diferente nas populações estudadas.

Assim, observamos uma relação positiva entre duas células da imunidade inata com o bom prognóstico da febre da dengue. As PDCs e as células NK são conhecidamente células com funções efetoras antivirais, porém pouco estudadas na imunopatologia do DENV. Objetivamos com esse trabalho contribuir tanto para o conhecimento dos mecanismos biológicos das células estudadas quanto para os mecanismos reguladores antivirais durante a dengue que poderiam ser protetores eliminando rapidamente o vírus ou reduzindo sua carga viral até que a imunidade adaptativa seja acionada.

## 7 Referências Bibliográficas

---

1. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB International; 1997. p. 1-22.
2. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480-96. PubMed PMID: 9665979.
3. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*. 2004 Oct;80(948):588-601. PubMed PMID: 15466994.
4. Rodriguez-Roche R, Gould EA. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *BioMed research international*. 2013;2013:690835. PubMed PMID: 23936833. Pubmed Central PMCID: 3722981.
5. Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*. 2006 Jul 8;368(9530):170-3. PubMed PMID: 16829301.
6. O.M.S. *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control* Geneva, Switzerland: OMS press; 2009. Available from: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>.
7. Hadinegoro SR. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? *Paediatrics and international child health*. 2012 May;32 Suppl 1:33-8. PubMed PMID: 22668448. Pubmed Central PMCID: 3381438.
8. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983 Jan-Feb;25(1):53-4. PubMed PMID: 6879054. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota previa.
9. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986 Apr-Jun;81(2):245-6. PubMed PMID: 3587006.
10. Vasconcelos PF, Mota K, Straatmann A, Santos-Torres S, da Rosa AP, Tavares Neto J. [A dengue epidemic in Ipujiara and Prado, Bahia. A seroepidemiologic survey]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000 Jan-Feb;33(1):61-7. PubMed PMID: 10881120. Epidemia de dengue em Ipujiara e Prado, Bahia. Inquerito soro-epidemiológico.
11. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990 Apr-Jun;85(2):253. PubMed PMID: 2087163.
12. De Simone TS, Nogueira RM, Araujo ES, Guimaraes FR, Santos FB, Schatzmayr HG, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004 Sep;98(9):553-62. PubMed PMID: 15251405.
13. Secretaria-de-Vigilância-em-Saúde. *Dengue - Boletim da Semana 14/2005* 2005 [10/05/2006].
14. Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011 May;17(5):938-40. PubMed PMID: 21529421. Pubmed Central PMCID: 3321786.
15. Siqueira JB, Jr., Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jan;11(1):48-53. PubMed PMID: 15705322.
16. Ministério-da-Saúde. *BALANÇO DENGUE: Situação epidemiológica e atividades desenvolvidas 2011*.
17. Portal-Brasil. *Saúde libera mais de R\$ 360 mi para combate à dengue 2013*. Available from: <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/11/saude-libera-mais-de-r-360-mi-para-combate-a-dengue>.
18. Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annual review of microbiology*. 2008;62:71-92. PubMed PMID: 18429680. eng.
19. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan;3(1):13-22. PubMed PMID: 15608696.
20. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Aug;67(16):2773-86. PubMed PMID: 20372965. Epub 2010/04/08. eng.
21. Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*. 2004 Sep;12(9):1607-18. PubMed PMID: 15341726.
22. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008 Aug;11(4):369-77. PubMed PMID: 18644250.

23. Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*. 1996 Jun 1;220(1):232-40. PubMed PMID: 8659120.
24. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem*. 2007 Mar 23;282(12):8873-82. PubMed PMID: 17276984.
25. Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*. 2006 Sep;87(Pt 9):2605-14. PubMed PMID: 16894199.
26. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog*. 2008 Dec;4(12):e1000244. PubMed PMID: 19096510. Pubmed Central PMCID: 2592694.
27. Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res*. 2008 Oct;80(1):11-22. PubMed PMID: 18585795.
28. Back AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infection ecology & epidemiology*. 2013;3. PubMed PMID: 24003364. Pubmed Central PMCID: 3759171.
29. Kangwanpong D, Bhamarapavati N, Lucia HL. Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the in situ PCR method: a case report. *Clin Diagn Virol*. 1995 Feb;3(2):165-72. PubMed PMID: 15566798.
30. de Araujo JM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, et al. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods*. 2009 Jan;155(1):34-8. PubMed PMID: 18951921.
31. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol*. 1997 Jul-Aug;16(4):204-8. PubMed PMID: 9266146. Epub 1997/07/01. eng.
32. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*. 2004 Apr 15;189(8):1411-8. PubMed PMID: 15073678. Epub 2004/04/10. eng.
33. Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008 Jul 5;376(2):429-35. PubMed PMID: 18452966. eng.
34. Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WW, Rose RC, Schlesinger JJ, et al. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. 2008 Jan;80(1):134-46. PubMed PMID: 18041019.
35. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg*. 2000 Jul-Aug;63(1-2):71-5. PubMed PMID: 11357999.
36. Pham AM, Langlois RA, TenOever BR. Replication in cells of hematopoietic origin is necessary for Dengue virus dissemination. *PLoS pathogens*. 2012 Jan;8(1):e1002465. PubMed PMID: 22241991. Pubmed Central PMCID: 3252368. Epub 2012/01/14. eng.
37. Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis*. 2005;5:64. PubMed PMID: 16109165.
38. Bente DA, Rico-Hesse R. Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models*. 2006;3(1):97-103. PubMed PMID: 18087566.
39. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med*. 2000 Jul;6(7):816-20. PubMed PMID: 10888933.
40. Rothman AL. Viral pathogenesis of dengue infections. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB International; 1997. p. 245-70.
41. Alen MM, Schols D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *J Trop Med*. 2012;2012:628475. PubMed PMID: 22529868. Pubmed Central PMCID: 3317058. Epub 2012/04/25. eng.
42. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*. 2003 Jul;4(7):723-8. PubMed PMID: 12783086.
43. Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Apr 7;197(7):823-9. PubMed PMID: 12682107.

44. Miller JL, deWet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog.* 2008 Feb 8;4(2):e17. PubMed PMID: 18266465.
45. Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):2650-7. PubMed PMID: 10074110.
46. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 1997 Aug;3(8):866-71. PubMed PMID: 9256277.
47. Yacoub S, Mongkolsapaya J, Screaton G. The pathogenesis of dengue. *Curr Opin Infect Dis.* 2013 Jun;26(3):284-9. PubMed PMID: 23449140.
48. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):476-81. PubMed PMID: 3277268.
49. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg.* 1988 Mar;38(2):411-9. PubMed PMID: 3354774.
50. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;60:421-67. PubMed PMID: 14689700.
51. Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Apr;40(4):444-51. PubMed PMID: 2712199.
52. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2008 Oct;225:300-13. PubMed PMID: 18837790. Epub 2008/10/08. eng.
53. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):2-9. PubMed PMID: 10608744.
54. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4738-47. PubMed PMID: 10233934.
55. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* 1999 Oct 23;354(9188):1431-4. PubMed PMID: 10543670.
56. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol.* 2005 Jan;79(2):853-9. PubMed PMID: 15613313.
57. Diaz FJ, Black WCt, Farfan-Ale JA, Lorono-Pino MA, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. *Arch Med Res.* 2006 Aug;37(6):760-73. PubMed PMID: 16824937.
58. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, et al. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS neglected tropical diseases.* 2010;4(3):e617. PubMed PMID: 20209155. Pubmed Central PMCID: 2830471.
59. Fang X, Hu Z, Shang W, Zhu J, Xu C, Rao X. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Nov;66(2):134-46. PubMed PMID: 22624675.
60. Xavier-Carvalho C, Gibson G, Brasil P, Ferreira RX, de Souza Santos R, Goncalves Cruz O, et al. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case-control, functional and meta-analysis study. *Infect Genet Evol.* 2013 Dec;20:197-205. PubMed PMID: 24016730.
61. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Sep;65(3):180-3. PubMed PMID: 11561700.
62. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003 Jul;9(7):921-7. PubMed PMID: 12808447.
63. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol.* 2006 Mar 15;176(6):3821-9. PubMed PMID: 16517753.
64. Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Sep 28;107(39):16922-7. PubMed PMID: 20837518. Pubmed Central PMCID: 2947904.

65. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 2011 Feb;30(1):16-34. PubMed PMID: 21235323. Epub 2011/01/18. eng.
66. Wehner R, Dietze K, Bachmann M, Schmitz M. The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun*. 2011;3(3):258-63. PubMed PMID: 21411969.
67. Green AM, Beatty PR, Hadjilaou A, Harris E. Innate Immunity to Dengue Virus Infection and Subversion of Antiviral Responses. *J Mol Biol*. 2014 Mar 20;426(6):1148-60. PubMed PMID: 24316047.
68. Ng CS, Kato H, Fujita T. Recognition of viruses in the cytoplasm by RLRs and other helicases--how conformational changes, mitochondrial dynamics and ubiquitination control innate immune responses. *Int Immunol*. 2012 Dec;24(12):739-49. PubMed PMID: 23087188.
69. Nasirudeen AM, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam KP, Liu DX. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(1):e926. PubMed PMID: 21245912. Pubmed Central PMCID: 3014945.
70. Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, Patel JR, Savage T, Gutman D, et al. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS pathogens*. 2012 Oct;8(10):e1002934. PubMed PMID: 23055924. Pubmed Central PMCID: 3464218. Epub 2012/10/12. eng.
71. Perry ST, Prestwood TR, Lada SM, Benedict CA, Shresta S. Cardif-mediated signaling controls the initial innate response to dengue virus in vivo. *J Virol*. 2009 Aug;83(16):8276-81. PubMed PMID: 19494017. Pubmed Central PMCID: 2715757.
72. Fredericksen BL, Gale M, Jr. West Nile virus evades activation of interferon regulatory factor 3 through RIG-I-dependent and -independent pathways without antagonizing host defense signaling. *J Virol*. 2006 Mar;80(6):2913-23. PubMed PMID: 16501100. Pubmed Central PMCID: 1395472.
73. Olganier D, Scholte FE, Chiang C, Albuлесcu IC, Nichols C, He Z, et al. Inhibition of Dengue and Chikungunya Virus Infections by RIG-I-Mediated Type I Interferon-Independent Stimulation of the Innate Antiviral Response. *J Virol*. 2014 Apr;88(8):4180-94. PubMed PMID: 24478443.
74. Wang JP, Liu P, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW, Libraty DH. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J Immunol*. 2006 Nov 15;177(10):7114-21. PubMed PMID: 17082628. eng.
75. Tsai YT, Chang SY, Lee CN, Kao CL. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cellular microbiology*. 2009 Apr;11(4):604-15. PubMed PMID: 19134117. Epub 2009/01/13. eng.
76. Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Zagne SM, et al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology*. 2010 Jun;130(2):202-16. PubMed PMID: 20113369. Pubmed Central PMCID: 2878465.
77. Torres S, Hernandez JC, Giraldo D, Arboleda M, Rojas M, Smit JM, et al. Differential expression of Toll-like receptors in dendritic cells of patients with dengue during early and late acute phases of the disease. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(2):e2060. PubMed PMID: 23469297. Pubmed Central PMCID: 3585035.
78. Sariol CA, Martinez MI, Rivera F, Rodriguez IV, Pantoja P, Abel K, et al. Decreased dengue replication and an increased anti-viral humoral response with the use of combined Toll-like receptor 3 and 7/8 agonists in macaques. *PLoS One*. 2011;6(4):e19323. PubMed PMID: 21559444. Pubmed Central PMCID: 3084804. Epub 2011/05/12. eng.
79. Wong KL, Chen W, Balakrishnan T, Toh YX, Fink K, Wong SC. Susceptibility and response of human blood monocyte subsets to primary dengue virus infection. *PLoS One*. 2012;7(5):e36435. PubMed PMID: 22574162. Pubmed Central PMCID: 3344872. Epub 2012/05/11. eng.
80. Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Dec;104(8):1091-9. PubMed PMID: 20140369. Epub 2010/02/09. eng.
81. Reis SR, Sampaio AL, Henriques MG, 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 Dec;102(8):983-90. PubMed PMID: 18209938.
82. Sun P, Bauza K, Pal S, Liang Z, Wu SJ, Beckett C, et al. Infection and activation of human peripheral blood monocytes by dengue viruses through the mechanism of antibody-dependent enhancement. *Virology*. 2011 Dec 20;421(2):245-52. PubMed PMID: 22033262.
83. Arias J, Valero N, Mosquera J, Montiel M, Reyes E, Larreal Y, et al. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology*. 2014 Mar;452-453:42-51. PubMed PMID: 24606681.

84. Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses*. 2012 Jan;4(1):62-82. PubMed PMID: 22355452. Pubmed Central PMCID: 3280519.
85. Becerra A, Warke RV, Martin K, Xhaja K, de Bosch N, Rothman AL, et al. Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. *J Med Virol*. 2009 Aug;81(8):1403-11. PubMed PMID: 19551822. Pubmed Central PMCID: 2893327. Epub 2009/06/25. eng.
86. Gandini M, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Freire Mda S, Galler R, et al. Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF-alpha and IFN-alpha profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106(5):594-605. PubMed PMID: 21894381. Epub 2011/09/07. eng.
87. Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, Kao CL, Chang DM, Han SW, et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol*. 2001 Feb 1;166(3):1499-506. PubMed PMID: 11160189.
88. Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol*. 2001 Apr;75(8):3501-8. PubMed PMID: 11264339.
89. Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, Wu SJ, et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2001 Dec;6(3):219-24. PubMed PMID: 11924831.
90. Sun P, Fernandez S, Marovich MA, Palmer DR, Celluzzi CM, Boonnak K, et al. Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. *Virology*. 2009 Jan 20;383(2):207-15. PubMed PMID: 19013627. eng.
91. Nightingale ZD, Patkar C, Rothman AL. Viral replication and paracrine effects result in distinct, functional responses of dendritic cells following infection with dengue 2 virus. *Journal of leukocyte biology*. 2008 Oct;84(4):1028-38. PubMed PMID: 18653464. eng.
92. Aleyas AG, George JA, Han YW, Rahman MM, Kim SJ, Han SB, et al. Functional modulation of dendritic cells and macrophages by Japanese encephalitis virus through MyD88 adaptor molecule-dependent and -independent pathways. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2462-74. PubMed PMID: 19635909.
93. Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med*. 2005 Nov 7;202(9):1179-84. PubMed PMID: 16260489.
94. Chase AJ, Medina FA, Munoz-Jordan JL. Impairment of CD4+ T cell polarization by dengue virus-infected dendritic cells. *J Infect Dis*. 2011 Jun 15;203(12):1763-74. PubMed PMID: 21606535.
95. Palmer DR, Sun P, Celluzzi C, Bisbing J, Pang S, Sun W, et al. Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *J Virol*. 2005 Feb;79(4):2432-9. PubMed PMID: 15681444. eng.
96. Srikiatkachorn A, Spiropoulou CF. Vascular events in viral hemorrhagic fevers: a comparative study of dengue and hantaviruses. *Cell and tissue research*. 2014 Mar;355(3):621-33. PubMed PMID: 24623445.
97. Lima-Junior RS, Mello Cda S, Siani AC, Valente LM, Kubelka CF. Uncaria tomentosa alkaloidal fraction reduces paracellular permeability, IL-8 and NS1 production on human microvascular endothelial cells infected with dengue virus. *Nat Prod Commun*. 2013 Nov;8(11):1547-50. PubMed PMID: 24427938.
98. Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC infectious diseases*. 2005;5:64. PubMed PMID: 16109165. Pubmed Central PMCID: 1208887. Epub 2005/08/20. eng.
99. Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med J*. 1991 Jun;36(2):63-5. PubMed PMID: 1913986.
100. Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignacio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, et al. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Feb;96(2):229-32. PubMed PMID: 11285501.
101. Kubelka CF, Borges PA, VonSydow FF, Lampe E. Analysis of tumor necrosis factor-alpha serum level in Brazilian patients with Dengue-2. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995 Nov-Dec;90(6):741-2. PubMed PMID: 8731370.
102. Pinto LM, Oliveira SA, Braga EL, Nogueira RM, Kubelka CF. Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in

- Brazilian patients during exanthematic dengue fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999 May-Jun;94(3):387-94. PubMed PMID: 10348988.
103. Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis.* 2004 Jan 15;189(2):221-32. PubMed PMID: 14722886.
  104. Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thrombosis and haemostasis.* 2002 Jan;87(1):42-6. PubMed PMID: 11858187. eng.
  105. Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001 Apr;30(3):229-33. PubMed PMID: 11335143. Epub 2001/05/04. eng.
  106. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol.* 2006 Feb;143(2):345-56. PubMed PMID: 16412060. Pubmed Central PMCID: 1809585. Epub 2006/01/18. eng.
  107. Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology.* 2001 Dec;204(4):494-507. PubMed PMID: 11776403.
  108. Tsai TT, Chuang YJ, Lin YS, Wan SW, Chen CL, Lin CF. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. *J Biomed Sci.* 2013;20:40. PubMed PMID: 23800014. Pubmed Central PMCID: 3700829.
  109. Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *The Indian journal of medical research.* 2006 Jan;123(1):25-30. PubMed PMID: 16567864. eng.
  110. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008;8:86. PubMed PMID: 18578883.
  111. Pacsa AS, Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000 Jun;28(2):151-5. PubMed PMID: 10799806. Epub 2000/05/09. eng.
  112. Chen RF, Yang KD, Wang L, Liu JW, Chiu CC, Cheng JT. Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Nov;101(11):1106-13. PubMed PMID: 17764712. Epub 2007/09/04. eng.
  113. Silveira GF, Meyer F, Delfraro A, Mosimann AL, Coluchi N, Vasquez C, et al. Dengue virus type 3 isolated from a fatal case with visceral complications induces enhanced proinflammatory responses and apoptosis of human dendritic cells. *J Virol.* 2011 Jun;85(11):5374-83. PubMed PMID: 21450836. Pubmed Central PMCID: 3094967.
  114. Vasquez Ochoa M, Garcia Cordero J, Gutierrez Castaneda B, Santos Argumedo L, Villegas Sepulveda N, Cedillo Barron L. A clinical isolate of dengue virus and its proteins induce apoptosis in HMEC-1 cells: a possible implication in pathogenesis. *Arch Virol.* 2009;154(6):919-28. PubMed PMID: 19440830.
  115. Haeryfar SM. The importance of being a pDC in antiviral immunity: the IFN mission versus Ag presentation? *Trends Immunol.* 2005 Jun;26(6):311-7. PubMed PMID: 15922947. Epub 2005/06/01. eng.
  116. Suthar MS, Aguirre S, Fernandez-Sesma A. Innate immune sensing of flaviviruses. *PLoS Pathog.* 2013 Sep;9(9):e1003541. PubMed PMID: 24068919. Pubmed Central PMCID: 3771895.
  117. Warke RV, Martin KJ, Giaya K, Shaw SK, Rothman AL, Bosch I. TRAIL is a novel antiviral protein against dengue virus. *J Virol.* 2008 Jan;82(1):555-64. PubMed PMID: 17913827. Pubmed Central PMCID: 2224358. Epub 2007/10/05. eng.
  118. Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine.* 2013 Jan 7;31(3):461-71. PubMed PMID: 23153447.
  119. Pichyangkul S, Endy TP, Kalayanarooj S, Nisalak A, Yongvanitchit K, Green S, et al. A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. *J Immunol.* 2003 Nov 15;171(10):5571-8. PubMed PMID: 14607965. eng.
  120. De Carvalho Bittencourt M, Martial J, Cabie A, Thomas L, Cesaire R. Decreased peripheral dendritic cell numbers in dengue virus infection. *J Clin Immunol.* 2012 Feb;32(1):161-72. PubMed PMID: 21969208. Epub 2011/10/05. eng.
  121. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:227-58. PubMed PMID: 23516982. Pubmed Central PMCID: 3868343.

122. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Rothman AL, Livingston PG, et al. Human immune responses to dengue viruses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1990 Dec;21(4):658-62. PubMed PMID: 1983049.
123. Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Nisalak A, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1999 Nov;180(5):1429-35. PubMed PMID: 10515800.
124. Wahid SF, Sanusi S, Zawawi MM, Ali RA. A comparison of the pattern of liver involvement in dengue hemorrhagic fever with classic dengue fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2000 Jun;31(2):259-63. PubMed PMID: 11127322.
125. Chau TN, Quyen NT, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Dung NT, et al. Dengue in Vietnamese infants--results of infection-enhancement assays correlate with age-related disease epidemiology, and cellular immune responses correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15;198(4):516-24. PubMed PMID: 18598189. Pubmed Central PMCID: 2730540.
126. Yossef R, Rosental B, Appel MY, Hershkovitz O, Porgador A. Upregulation of MHC class I expression following dengue virus infection: the mechanism at the promoter level. Expert review of anti-infective therapy. 2012 Mar;10(3):285-7. PubMed PMID: 22397562.
127. Hershkovitz O, Zilka A, Bar-Ilan A, Abutbul S, Davidson A, Mazzon M, et al. Dengue virus replicon expressing the nonstructural proteins suffices to enhance membrane expression of HLA class I and inhibit lysis by human NK cells. *J Virol*. 2008 Aug;82(15):7666-76. PubMed PMID: 18508882. Pubmed Central PMCID: 2493327.
128. Eberl G. A new vision of immunity: homeostasis of the superorganism. *Mucosal immunology*. 2010 Sep;3(5):450-60. PubMed PMID: 20445502.
129. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010 Jan 15;327(5963):291-5. PubMed PMID: 20075244. Pubmed Central PMCID: 3645875.
130. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999 Jun 11;284(5421):1835-7. PubMed PMID: 10364556. Epub 1999/06/12. eng.
131. Trinchieri G, Santoli D, Dee RR, Knowles BB. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *J Exp Med*. 1978 May 1;147(5):1299-313. PubMed PMID: 650155. Pubmed Central PMCID: 2184278.
132. Guery L, Hugues S. Tolerogenic and activatory plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Front Immunol*. 2013;4:59. PubMed PMID: 23508732. Pubmed Central PMCID: 3589693.
133. Mathan TS, Figdor CG, Buschow SI. Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. *Front Immunol*. 2013;4:372. PubMed PMID: 24282405. Pubmed Central PMCID: 3825182.
134. Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*. 2007 Jun;26(6):741-50. PubMed PMID: 17582346. eng.
135. Tang F, Du Q, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity. *Sci China Life Sci*. 2010 Feb;53(2):172-82. PubMed PMID: 20596824. Epub 2010/07/03. eng.
136. Tel J, van der Leun AM, Figdor CG, Torensma R, de Vries IJ. Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Aug;61(8):1279-88. PubMed PMID: 22294456. Pubmed Central PMCID: 3401502.
137. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6037-46. PubMed PMID: 11086035.
138. Cao W, Bover L. Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Rev*. 2010 Mar;234(1):163-76. PubMed PMID: 20193018. Pubmed Central PMCID: 2919054. Epub 2010/03/03. eng.
139. Cao W, Rosen DB, Ito T, Bover L, Bao M, Watanabe G, et al. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med*. 2006 Jun 12;203(6):1399-405. PubMed PMID: 16735691. Pubmed Central PMCID: 2118323. Epub 2006/06/01. eng.
140. Dzionek A, Sohna Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med*. 2001 Dec 17;194(12):1823-34. PubMed PMID: 11748283. Pubmed Central PMCID: 2193584.
141. Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:134-40. PubMed PMID: 11138771.
142. Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin

- diseases. *The Journal of investigative dermatology*. 2002 Nov;119(5):1096-102. PubMed PMID: 12445198.
143. Cox K, North M, Burke M, Singhal H, Renton S, Aqel N, et al. Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the major DC subset innately producing cytokines in human lymph nodes. *Journal of leukocyte biology*. 2005 Nov;78(5):1142-52. PubMed PMID: 16260587.
  144. Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol*. 2002 Dec;63(12):1164-71. PubMed PMID: 12480260.
  145. Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, et al. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol*. 2004 Jul;16(7):915-28. PubMed PMID: 15159375.
  146. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*. 1999 Aug;5(8):919-23. PubMed PMID: 10426316.
  147. Smit JJ, Rudd BD, Lukacs NW. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J Exp Med*. 2006 May 15;203(5):1153-9. PubMed PMID: 16682497. Pubmed Central PMCID: 2121199. Epub 2006/05/10. eng.
  148. Lund JM, Linehan MM, Iijima N, Iwasaki A. Cutting Edge: Plasmacytoid dendritic cells provide innate immune protection against mucosal viral infection in situ. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):7510-4. PubMed PMID: 17114418.
  149. Gerlini G, Mariotti G, Bianchi B, Pimpinelli N. Massive recruitment of type I interferon producing plasmacytoid dendritic cells in varicella skin lesions. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006 Feb;126(2):507-9. PubMed PMID: WOS:000238968400037. English.
  150. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*. 2005 Jul 4;202(1):135-43. PubMed PMID: 15998792. Pubmed Central PMCID: 2212894.
  151. Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol*. 2001 Jul;159(1):237-43. PubMed PMID: 11438470. Pubmed Central PMCID: 1850412.
  152. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010 Jan;1183:89-103. PubMed PMID: 20146710. Epub 2010/02/12. eng.
  153. Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *European journal of immunology*. 1999 Sep;29(9):2769-78. PubMed PMID: 10508251.
  154. Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol*. 1996 Jul 15;157(2):541-8. PubMed PMID: 8752900.
  155. Amigorena S, Bonnerot C. Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing. *Immunol Rev*. 1999 Dec;172:279-84. PubMed PMID: 10631953.
  156. Benitez-Ribas D, Adema GJ, Winkels G, Klasen IS, Punt CJ, Figdor CG, et al. Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc gamma RII-mediated uptake. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1629-35. PubMed PMID: 16785312. Pubmed Central PMCID: 2118356.
  157. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, et al. Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med*. 1999 Jan 18;189(2):371-80. PubMed PMID: 9892619. Pubmed Central PMCID: 2192989.
  158. Novak N, Allam JP, Hagemann T, Jenneck C, Laffer S, Valenta R, et al. Characterization of Fc epsilon RI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Aug;114(2):364-70. PubMed PMID: 15316517.
  159. Wu P, Wu J, Liu S, Han X, Lu J, Shi Y, et al. TLR9/TLR7-triggered downregulation of BDCA2 expression on human plasmacytoid dendritic cells from healthy individuals and lupus patients. *Clin Immunol*. 2008 Oct;129(1):40-8. PubMed PMID: 18684674.
  160. Cao W, Zhang L, Rosen DB, Bover L, Watanabe G, Bao M, et al. BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS biology*. 2007 Sep 11;5(10):e248. PubMed PMID: 17850179. Pubmed Central PMCID: 1971124.
  161. Tel J, Benitez-Ribas D, Hoosmans S, Cambi A, Adema GJ, Figdor CG, et al. DEC-205 mediates antigen uptake and presentation by both resting and activated human plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology*. 2011 Apr;41(4):1014-23. PubMed PMID: 21413003.

162. Meyer-Wentrup F, Benitez-Ribas D, Tacke P, Punt CJ, Figdor CG, de Vries IJ, et al. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN- $\alpha$  production. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4245-53. PubMed PMID: 18258799.
163. Lahoud MH, Ahmet F, Zhang JG, Meuter S, Policheni AN, Kitsoulis S, et al. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 2;109(40):16270-5. PubMed PMID: 22988114. Pubmed Central PMCID: 3479608.
164. Medzhitov R. Pattern recognition theory and the launch of modern innate immunity. *J Immunol*. 2013 Nov 1;191(9):4473-4. PubMed PMID: 24141853.
165. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):305-15. PubMed PMID: 20346772.
166. Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, et al. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity*. 2004 Jul;21(1):107-19. PubMed PMID: 15345224.
167. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2006 Sep 15;177(6):3515-9. PubMed PMID: 16951309.
168. Hanagata N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2181-95. PubMed PMID: 22619554. Pubmed Central PMCID: 3356174.
169. Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Muller T, Latz E, et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity*. 2008 Mar;28(3):315-23. PubMed PMID: 18342006.
170. Yasuda K, Rutz M, Schlatter B, Metzger J, Luppa PB, Schmitz F, et al. CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. *European journal of immunology*. 2006 Feb;36(2):431-6. PubMed PMID: 16421948.
171. Cervantes JL, Weinerman B, Basole C, Salazar JC. TLR8: the forgotten relative revindicated. *Cellular & molecular immunology*. 2012 Nov;9(6):434-8. PubMed PMID: 23085951. Pubmed Central PMCID: 3498840.
172. Eberle F, Sirin M, Binder M, Dalpke AH. Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors. *European journal of immunology*. 2009 Sep;39(9):2537-47. PubMed PMID: 19662634.
173. Abdelsadik A, Trad A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*. 2011 Dec;72(12):1188-93. PubMed PMID: 21920397.
174. Cervantes JL, Dunham-Ems SM, La Vake CJ, Petzke MM, Sahay B, Sellati TJ, et al. Phagosomal signaling by *Borrelia burgdorferi* in human monocytes involves Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR8 cooperativity and TLR8-mediated induction of IFN- $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 1;108(9):3683-8. PubMed PMID: 21321205. Pubmed Central PMCID: 3048123.
175. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1526-9. PubMed PMID: 14976262.
176. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1529-31. PubMed PMID: 14976261.
177. Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, et al. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J*. 1998 Nov 2;17(21):6230-40. PubMed PMID: 9799232. Pubmed Central PMCID: 1170949.
178. Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober HJ, Okamoto K, et al. Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science*. 2008 Feb 1;319(5863):624-7. PubMed PMID: 18239127.
179. Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*. 2008 Dec 4;456(7222):658-62. PubMed PMID: 18820679. Pubmed Central PMCID: 2596276.
180. Sepulveda FE, Maschalidi S, Colisson R, Heslop L, Ghirelli C, Sakka E, et al. Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity*. 2009 Nov 20;31(5):737-48. PubMed PMID: 19879164.
181. Honda K, Ohba Y, Yanai H, Negishi H, Mizutani T, Takaoka A, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature*. 2005 Apr 21;434(7036):1035-40. PubMed PMID: 15815647.
182. Guiducci C, Ott G, Chan JH, Damon E, Calacsan C, Matray T, et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med*.

- 2006 Aug 7;203(8):1999-2008. PubMed PMID: 16864658. Pubmed Central PMCID: 2118381. Epub 2006/07/26. eng.
183. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 2005 Apr 7;434(7034):772-7. PubMed PMID: 15800576.
  184. Colina R, Costa-Mattioli M, Dowling RJ, Jaramillo M, Tai LH, Breitbach CJ, et al. Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature*. 2008 Mar 20;452(7185):323-8. PubMed PMID: 18272964. Epub 2008/02/15. eng.
  185. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2003 May 1;170(9):4465-74. PubMed PMID: 12707322.
  186. LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM, Reis e Sousa C, Acha-Orbea H, Reith W. MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat Immunol*. 2004 Sep;5(9):899-908. PubMed PMID: 15322541.
  187. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007 Sep 27;449(7161):419-26. PubMed PMID: 17898760.
  188. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol*. 2000 Oct;1(4):305-10. PubMed PMID: 11017101. Epub 2001/03/23. eng.
  189. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. 1999 Feb 19;283(5405):1183-6. PubMed PMID: 10024247.
  190. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med*. 2007 Jan 22;204(1):105-15. PubMed PMID: 17200410. Pubmed Central PMCID: 2118437.
  191. Ogata M, Ito T, Shimamoto K, Nakanishi T, Satsutani N, Miyamoto R, et al. Plasmacytoid dendritic cells have a cytokine-producing capacity to enhance ICOS ligand-mediated IL-10 production during T-cell priming. *Int Immunol*. 2013 Mar;25(3):171-82. PubMed PMID: 23125331.
  192. Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol*. 2007 Sep;81(17):9249-58. PubMed PMID: 17567698. Pubmed Central PMCID: 1951397.
  193. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704. PubMed PMID: 18173375.
  194. Ito T, Amakawa R, Inaba M, Hori T, Ota M, Nakamura K, et al. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4253-9. PubMed PMID: 15034038.
  195. Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2003 Sep;23(9):513-22. PubMed PMID: 14565860.
  196. Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, et al. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol*. 2003 Oct;4(10):1009-15. PubMed PMID: 14502286.
  197. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med*. 2005 Sep 5;202(5):637-50. PubMed PMID: 16129706. Pubmed Central PMCID: 2212878.
  198. Krug A, Uppaluri R, Facchetti F, Dorner BG, Sheehan KC, Schreiber RD, et al. IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6079-83. PubMed PMID: 12444109.
  199. Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu YJ. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2423-31. PubMed PMID: 16293610.
  200. Bao M, Liu YJ. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell*. 2013 Jan;4(1):40-52. PubMed PMID: 23132256. Pubmed Central PMCID: 3667388.
  201. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society*. 1957 Sep 12;147(927):258-67. PubMed PMID: 13465720.
  202. de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem*. 2007 Jul 13;282(28):20053-7. PubMed PMID: 17502368.

203. Rauch I, Muller M, Decker T. The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *Jak-Stat*. 2013 Jan 1;2(1):e23820. PubMed PMID: 24058799. Pubmed Central PMCID: 3670275.
204. Hervas-Stubbs S, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A, Melero I. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):2619-27. PubMed PMID: 21372217.
205. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol*. 2011 Dec;1(6):519-25. PubMed PMID: 22328912. Pubmed Central PMCID: 3274382. Epub 2012/02/14. eng.
206. Boo KH, Yang JS. Intrinsic cellular defenses against virus infection by antiviral type I interferon. *Yonsei medical journal*. 2010 Jan;51(1):9-17. PubMed PMID: 20046508. Pubmed Central PMCID: 2799977.
207. Diamond MS, Farzan M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jan;13(1):46-57. PubMed PMID: 23237964. Pubmed Central PMCID: 3773942.
208. Gong B, Almasan A. Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000 Nov 30;278(3):747-52. PubMed PMID: WOS:000165701900040. English.
209. Sin WX, Li P, Yeong JP, Chin KC. Activation and regulation of interferon-beta in immune responses. *Immunol Res*. 2012 Sep;53(1-3):25-40. PubMed PMID: 22411096.
210. Lopez CB, Hermesh T. Systemic responses during local viral infections: type I IFNs sound the alarm. *Curr Opin Immunol*. 2011 Aug;23(4):495-9. PubMed PMID: 21752617. Pubmed Central PMCID: 3163724.
211. Benlahrech A, Donaghy H, Rozis G, Goodier M, Klavinskis L, Gotch F, et al. Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon gamma Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways. *Sensors (Basel)*. 2009;9(1):386-403. PubMed PMID: 22389607. Pubmed Central PMCID: 3280753.
212. Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, et al. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol*. 2005 Jan 15;174(2):727-34. PubMed PMID: 15634892.
213. Hagberg N, Berggren O, Leonard D, Weber G, Bryceson YT, Alm GV, et al. IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes is promoted by NK cells via MIP-1beta and LFA-1. *J Immunol*. 2011 May 1;186(9):5085-94. PubMed PMID: 21430220.
214. Tel J, Anguille S, Waterborg CE, Smits EL, Figdor CG, de Vries IJ. Tumoricidal activity of human dendritic cells. *Trends Immunol*. 2014 Jan;35(1):38-46. PubMed PMID: 24262387.
215. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med*. 1999 Oct 18;190(8):1155-64. PubMed PMID: 10523613. Pubmed Central PMCID: 2195665.
216. Manna PP, Mohanakumar T. Human dendritic cell mediated cytotoxicity against breast carcinoma cells in vitro. *Journal of leukocyte biology*. 2002 Aug;72(2):312-20. PubMed PMID: 12149422.
217. Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1441-51. PubMed PMID: 17535975. Pubmed Central PMCID: 2118597. Epub 2007/05/31. eng.
218. Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens JP, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Immunology*. 2006 Jan 1;176(1):248-55. PubMed PMID: WOS:000234262600030. English.
219. Hardy AW, Graham DR, Shearer GM, Herbeuval JP. HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 30;104(44):17453-8. PubMed PMID: 17956986. Pubmed Central PMCID: 2077277. Epub 2007/10/25. eng.
220. Machmach K, Leal M, Gras C, Viciano P, Genebat M, Franco E, et al. Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *J Virol*. 2012 Apr;86(8):4245-52. PubMed PMID: 22318133. Pubmed Central PMCID: 3318617. Epub 2012/02/10. eng.
221. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*. 1996 May 31;271(22):12687-90. PubMed PMID: 8663110.
222. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995 Dec;3(6):673-82. PubMed PMID: 8777713.
223. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J*. 1997 Sep 1;16(17):5386-97. PubMed PMID: 9311998. Pubmed Central PMCID: 1170170.

224. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2375-80. PubMed PMID: 9858524. Pubmed Central PMCID: 2212426.
225. Kemp TJ, Moore JM, Griffith TS. Human B cells express functional TRAIL/Apo-2 ligand after CpG-containing oligodeoxynucleotide stimulation. *J Immunol*. 2004 Jul 15;173(2):892-9. PubMed PMID: 15240676.
226. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med*. 1999 Apr 19;189(8):1343-54. PubMed PMID: 10209050. Pubmed Central PMCID: 2193036. Epub 1999/04/20. eng.
227. Kemp TJ, Ludwig AT, Earel JK, Moore JM, Vanoosten RL, Moses B, et al. Neutrophil stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood*. 2005 Nov 15;106(10):3474-82. PubMed PMID: 16037389. Pubmed Central PMCID: 1895062.
228. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*. 1997 Aug 8;277(5327):815-8. PubMed PMID: 9242610.
229. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):1111-3. PubMed PMID: 9082980.
230. Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, et al. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med*. 1997 Oct 6;186(7):1165-70. PubMed PMID: 9314565. Pubmed Central PMCID: 2199077.
231. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. 1998 Jun 5;273(23):14363-7. PubMed PMID: 9603945.
232. Valley CC, Lewis AK, Mudaliar DJ, Perlmutter JD, Braun AR, Karim CB, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces death receptor 5 networks that are highly organized. *J Biol Chem*. 2012 Jun 15;287(25):21265-78. PubMed PMID: 22496450. Pubmed Central PMCID: 3375548.
233. Choi EA, Lei H, Maron DJ, Wilson JM, Barsoum J, Fraker DL, et al. Stat1-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and the cell-surface death signaling pathway by interferon beta in human cancer cells. *Cancer Res*. 2003 Sep 1;63(17):5299-307. PubMed PMID: 14500361.
234. Tu Z, Hamalainen-Laanaya HK, Crispe IN, Orloff MS. Synergy between TLR3 and IL-18 promotes IFN-gamma dependent TRAIL expression in human liver NK cells. *Cell Immunol*. 2011;271(2):286-91. PubMed PMID: 21802664.
235. Solis M, Goubau D, Romieu-Mourez R, Genin P, Civas A, Hiscott J. Distinct functions of IRF-3 and IRF-7 in IFN-alpha gene regulation and control of anti-tumor activity in primary macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2006 Nov 30;72(11):1469-76. PubMed PMID: 16846591.
236. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med*. 1999 May 3;189(9):1451-60. PubMed PMID: 10224285. Pubmed Central PMCID: 2193058.
237. Silke J, Hartland EL. Masters, marionettes and modulators: intersection of pathogen virulence factors and mammalian death receptor signaling. *Curr Opin Immunol*. 2013 Aug;25(4):436-40. PubMed PMID: 23800628.
238. Shirley S, Morizot A, Micheau O. Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2011 Sep;6(3):311-23. PubMed PMID: 21756247. Pubmed Central PMCID: 3204462.
239. Shepard BD, Badley AD. The Biology of TRAIL and the Role of TRAIL-Based Therapeutics in Infectious Diseases. *Antiinfect Agents Med Chem*. 2009 Apr 1;8(2):87-101. PubMed PMID: 21857885. Pubmed Central PMCID: 3158564. Epub 2009/04/01. Eng.
240. Gougeon ML, Herbeuval JP. IFN-alpha and TRAIL: a double edge sword in HIV-1 disease? *Exp Cell Res*. 2012 Jul 1;318(11):1260-8. PubMed PMID: 22480868. Epub 2012/04/07. eng.
241. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, et al. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *Journal of immunology*. 1999 Jul 15;163(2):920-6. PubMed PMID: 10395688. Epub 1999/07/08. eng.
242. Deng Z, Yan H, Hu J, Zhang S, Peng P, Liu Q, et al. Hepatitis C virus sensitizes host cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating DR4 and DR5 via a MEK1-dependent pathway. *PLoS One*. 2012;7(5):e37700. PubMed PMID: 22662193. Pubmed Central PMCID: 3360765.

243. Shrestha B, Pinto AK, Green S, Bosch I, Diamond MS. CD8+ T cells use TRAIL to restrict West Nile virus pathogenesis by controlling infection in neurons. *J Virol.* 2012 Sep;86(17):8937-48. PubMed PMID: 22740407. Pubmed Central PMCID: 3416144.
244. Swiecki M, Gilfillan S, Vermi W, Wang Y, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity.* 2010 Dec 14;33(6):955-66. PubMed PMID: 21130004. Pubmed Central PMCID: 3588567. Epub 2010/12/07. eng.
245. Belnoue E, Fontannaz P, Rochat AF, Tougne C, Bergthaler A, Lambert PH, et al. Functional limitations of plasmacytoid dendritic cells limit type I interferon, T cell responses and virus control in early life. *PLoS One.* 2013;8(12):e85302. PubMed PMID: 24376875. Pubmed Central PMCID: 3871569.
246. Evans VA, Lal L, Akkina R, Solomon A, Wright E, Lewin SR, et al. Thymic plasmacytoid dendritic cells are susceptible to productive HIV-1 infection and efficiently transfer R5 HIV-1 to thymocytes in vitro. *Retrovirology.* 2011;8:43. PubMed PMID: 21639903. Pubmed Central PMCID: 3118182.
247. Tsubouchi E, Akbar SM, Horiike N, Onji M. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol.* 2004 Aug;39(8):754-62. PubMed PMID: 15338369.
248. Varani S, Cederarv M, Feld S, Tammik C, Frascaroli G, Landini MP, et al. Human cytomegalovirus differentially controls B cell and T cell responses through effects on plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2007 Dec 1;179(11):7767-76. PubMed PMID: 18025223.
249. Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, Goode DJ, Macleod K, Arthos J, et al. HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 27;104(9):3396-401. PubMed PMID: 17360657. Pubmed Central PMCID: 1805537.
250. Chung NP, Matthews K, Klasse PJ, Sanders RW, Moore JP. HIV-1 gp120 impairs the induction of B cell responses by TLR9-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2012 Dec 1;189(11):5257-65. PubMed PMID: 23100517. Pubmed Central PMCID: 3504132.
251. Fang M, Xu N, Shao X, Yang J, Wu N, Yao H. Inhibitory effects of human immunodeficiency virus gp120 and Tat on CpG-A-induced inflammatory cytokines in plasmacytoid dendritic cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2012 Sep;44(9):797-804. PubMed PMID: 22814248.
252. Xu Y, Hu Y, Shi B, Zhang X, Wang J, Zhang Z, et al. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells. *Mol Immunol.* 2009 Aug;46(13):2640-6. PubMed PMID: 19501403.
253. Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, Shi CC, Janssen HL. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One.* 2011;6(1):e15324. PubMed PMID: 21246041. Pubmed Central PMCID: 3016396.
254. Tu Z, Zhang P, Li H, Niu J, Jin X, Su L. Cross-linking of CD81 by HCV-E2 protein inhibits human intrahepatic plasmacytoid dendritic cells response to CpG-ODN. *Cell Immunol.* 2013 Jul-Aug;284(1-2):98-103. PubMed PMID: 23954883.
255. Florentin J, Aouar B, Dental C, Thumann C, Firaguay G, Gondois-Rey F, et al. HCV glycoprotein E2 is a novel BDCA-2 ligand and acts as an inhibitor of IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2012 Nov 29;120(23):4544-51. PubMed PMID: 23053572.
256. Shi CC, Tjwa ET, Biesta PJ, Boonstra A, Xie Q, Janssen HL, et al. Hepatitis B virus suppresses the functional interaction between natural killer cells and plasmacytoid dendritic cells. *J Viral Hepat.* 2012 Feb;19(2):e26-33. PubMed PMID: 22239523.
257. Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Fuchs D, et al. HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2007 Apr 15;109(8):3351-9. PubMed PMID: 17158233. Pubmed Central PMCID: 1852248. Epub 2006/12/13. eng.
258. Hong HS, Bhatnagar N, Ballmaier M, Schubert U, Henklein P, Volgmann T, et al. Exogenous HIV-1 Vpr disrupts IFN- $\alpha$  response by plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and subsequent pDC/NK interplay. *Immunology letters.* 2009 Aug 15;125(2):100-4. PubMed PMID: 19559726.
259. Yonkers NL, Rodriguez B, Milkovich KA, Asaad R, Lederman MM, Heeger PS, et al. TLR ligand-dependent activation of naive CD4 T cells by plasmacytoid dendritic cells is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4436-44. PubMed PMID: 17372001.
260. Dental C, Florentin J, Aouar B, Gondois-Rey F, Durantel D, Baumert TF, et al. Hepatitis C virus fails to activate NF- $\kappa$ B signaling in plasmacytoid dendritic cells. *J Virol.* 2012 Jan;86(2):1090-6. PubMed PMID: 22090103. Pubmed Central PMCID: 3255840.
261. Wathelet MG, Orr M, Frieman MB, Baric RS. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J Virol.* 2007 Nov;81(21):11620-33. PubMed PMID: 17715225. Pubmed Central PMCID: 2168762.

262. Kamitani W, Huang C, Narayanan K, Lokugamage KG, Makino S. A two-pronged strategy to suppress host protein synthesis by SARS coronavirus Nsp1 protein. *Nature structural & molecular biology*. 2009 Nov;16(11):1134-40. PubMed PMID: 19838190. Pubmed Central PMCID: 2784181.
263. Narayanan K, Huang C, Lokugamage K, Kamitani W, Ikegami T, Tseng CT, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. *J Virol*. 2008 May;82(9):4471-9. PubMed PMID: 18305050. Pubmed Central PMCID: 2293030.
264. Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol*. 2008 Oct;89(Pt 10):2359-76. PubMed PMID: 18796704.
265. Sanchez R, Mohr I. Inhibition of cellular 2'-5' oligoadenylate synthetase by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol*. 2007 Apr;81(7):3455-64. PubMed PMID: 17229694. Pubmed Central PMCID: 1866071.
266. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*. 1999 Jul 2;285(5424):107-10. PubMed PMID: 10390359.
267. Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, Garcia-Sastre A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol*. 2009 Jun;83(11):5408-18. PubMed PMID: 19279106. Pubmed Central PMCID: 2681973. Epub 2009/03/13. eng.
268. O'Brien M, Manches O, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv Exp Med Biol*. 2013;762:71-107. PubMed PMID: 22975872. Pubmed Central PMCID: 3713461.
269. Donaghy H, Gazzard B, Gotch F, Patterson S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4505-11. PubMed PMID: 12576311.
270. Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis*. 2003 Jan 1;187(1):26-37. PubMed PMID: 12508143.
271. Nascimbeni M, Perie L, Chorro L, Diocou S, Kreitmann L, Louis S, et al. Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6112-9. PubMed PMID: 19366987.
272. Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, McKenna K, Dasilva I, Amara A, et al. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol*. 2004 May;78(10):5223-32. PubMed PMID: 15113904. Pubmed Central PMCID: 400371. Epub 2004/04/29. eng.
273. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest*. 2005 Nov;115(11):3265-75. PubMed PMID: 16224540. Pubmed Central PMCID: 1253628. Epub 2005/10/15. eng.
274. Meier A, Chang JJ, Chan ES, Pollard RB, Sidhu HK, Kulkarni S, et al. Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):955-9. PubMed PMID: 19597505. Pubmed Central PMCID: 2821111.
275. Barblu L, Machmach K, Gras C, Delfraissy JF, Boufassa F, Leal M, et al. Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) From HIV Controllers Produce Interferon-alpha and Differentiate Into Functional Killer pDCs Under HIV Activation. *J Infect Dis*. 2012 Sep;206(5):790-801. PubMed PMID: 22693234. Epub 2012/06/14. Eng.
276. Conry SJ, Milkovich KA, Yonkers NL, Rodriguez B, Bernstein HB, Asaad R, et al. Impaired plasmacytoid dendritic cell (PDC)-NK cell activity in viremic human immunodeficiency virus infection attributable to impairments in both PDC and NK cell function. *J Virol*. 2009 Nov;83(21):11175-87. PubMed PMID: 19692459. Pubmed Central PMCID: 2772797.
277. Herbeuval JP, Shearer GM. Are blockers of gp120/CD4 interaction effective inhibitors of HIV-1 immunopathogenesis? *AIDS reviews*. 2006 Jan-Mar;8(1):3-8. PubMed PMID: 16736946. Epub 2006/06/02. eng.
278. Mengshol JA, Golden-Mason L, Castelblanco N, Im KA, Dillon SM, Wilson CC, et al. Impaired plasmacytoid dendritic cell maturation and differential chemotaxis in chronic hepatitis C virus: associations with antiviral treatment outcomes. *Gut*. 2009 Jul;58(7):964-73. PubMed PMID: 19193669. Pubmed Central PMCID: 2689392.
279. Liang CC, Liu CH, Lin YL, Liu CJ, Chiang BL, Kao JH. Functional impairment of dendritic cells in patients infected with hepatitis C virus genotype 1 who failed peginterferon plus ribavirin therapy. *J Med Virol*. 2011 Jul;83(7):1212-20. PubMed PMID: 21567425.
280. Pelletier S, Bedard N, Said E, Ancuta P, Bruneau J, Shoukry NH. Sustained hyperresponsiveness of dendritic cells is associated with spontaneous resolution of acute

- hepatitis C. *J Virol.* 2013 Jun;87(12):6769-81. PubMed PMID: 23576504. Pubmed Central PMCID: 3676083.
281. Xu N, Yao HP, Lv GC, Chen Z. Downregulation of TLR7/9 leads to deficient production of IFN-alpha from plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis B. *Inflamm Res.* 2012 Sep;61(9):997-1004. PubMed PMID: 22684144.
  282. Malta FM, Bruno FR, Carvalho KI, Natri AC, Kalil J, Carrilho FJ, et al. HCV viremia drives an increment of CD86 expression by myeloid dendritic cells. *J Med Virol.* 2013 Nov;85(11):1919-24. PubMed PMID: 23926073.
  283. Shen T, Chen X, Chen Y, Xu Q, Lu F, Liu S. Increased PD-L1 expression and PD-L1/CD86 ratio on dendritic cells were associated with impaired dendritic cells function in HCV infection. *J Med Virol.* 2010 Jul;82(7):1152-9. PubMed PMID: 20513078.
  284. Hammond T, Lee S, Watson MW, Flexman JP, Cheng W, Price P. Decreased IFNgamma production correlates with diminished production of cytokines by dendritic cells in patients infected with hepatitis C virus and receiving therapy. *J Viral Hepat.* 2011 Jul;18(7):482-92. PubMed PMID: 20529204.
  285. Xie Q, Shen HC, Jia NN, Wang H, Lin LY, An BY, et al. Patients with chronic hepatitis B infection display deficiency of plasmacytoid dendritic cells with reduced expression of TLR9. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2009 Apr;11(4):515-23. PubMed PMID: 19289178.
  286. Pan X, Yao W, Fu J, Liu M, Li L, Gao X. Telbivudine improves the function of myeloid dendritic cells in patients with chronic hepatitis B. *Acta Virol.* 2012;56(1):31-8. PubMed PMID: 22404607.
  287. Shi M, Fu J, Shi F, Zhang B, Tang Z, Zhang Z, et al. Viral suppression correlates with dendritic cell restoration in chronic hepatitis B patients with autologous cytokine-induced killer cell transfusion. *Liver Int.* 2009 Mar;29(3):466-74. PubMed PMID: 18710425.
  288. Martinet J, Dufeu-Duchesne T, Bruder Costa J, Larrat S, Marlu A, Leroy V, et al. Altered functions of plasmacytoid dendritic cells and reduced cytolytic activity of natural killer cells in patients with chronic HBV infection. *Gastroenterology.* 2012 Dec;143(6):1586-96 e8. PubMed PMID: 22960656.
  289. Silva MC, Guerrero-Plata A, Gilfoy FD, Garofalo RP, Mason PW. Differential activation of human monocyte-derived and plasmacytoid dendritic cells by West Nile virus generated in different host cells. *J Virol.* 2007 Dec;81(24):13640-8. PubMed PMID: 17913823. Pubmed Central PMCID: 2168853.
  290. Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, et al. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol.* 2005 Jun 15;174(12):8163-72. PubMed PMID: 15944325.
  291. Rodriguez-Madoz JR, Belicha-Villanueva A, Bernal-Rubio D, Ashour J, Ayllon J, Fernandez-Sesma A. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. *J Virol.* 2010 Oct;84(19):9760-74. PubMed PMID: 20660196. Pubmed Central PMCID: 2937777. Epub 2010/07/28. eng.
  292. Munoz-Jordan JL, Fredericksen BL. How flaviviruses activate and suppress the interferon response. *Viruses.* 2010 Feb;2(2):676-91. PubMed PMID: 21994652. Pubmed Central PMCID: 3185611. Epub 2010/02/01. eng.
  293. Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol.* 2000 Jun;74(11):4957-66. PubMed PMID: 10799569.
  294. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer.* 1975 Aug 15;16(2):230-9. PubMed PMID: 1080480.
  295. Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Jr., Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol.* 1986 Nov 1;137(9):2735-9. PubMed PMID: 3489775.
  296. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *European journal of immunology.* 1975 Feb;5(2):117-21. PubMed PMID: 1086218.
  297. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011 Jan 7;331(6013):44-9. PubMed PMID: 21212348. Pubmed Central PMCID: 3089969.
  298. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986 Jun 15;136(12):4480-6. PubMed PMID: 3086432.
  299. Walzer T, Jaeger S, Chaix J, Vivier E. Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Curr Opin Immunol.* 2007 Jun;19(3):365-72. PubMed PMID: 17442558.
  300. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol.* 2011 Jan;12(1):21-7. PubMed PMID: 21113163.

301. Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, et al. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*. 2006 May 15;203(5):1343-55. PubMed PMID: 16682498. Pubmed Central PMCID: 2121214.
302. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*. 2009 Apr;126(4):458-65. PubMed PMID: 19278419. Pubmed Central PMCID: 2673358.
303. Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, Marcenaro E, et al. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 22;102(8):2886-91. PubMed PMID: 15699323. Pubmed Central PMCID: 549494.
304. Lin AW, Gonzalez SA, Cunningham-Rundles S, Dorante G, Marshall S, Tignor A, et al. CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*. 2004 Aug;137(2):408-16. PubMed PMID: 15270860. Pubmed Central PMCID: 1809111.
305. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1455-62. PubMed PMID: 14734722.
306. Hoglund P, Brodin P. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol*. 2010 Oct;10(10):724-34. PubMed PMID: 20818413.
307. Elliott JM, Yokoyama WM. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol*. 2011 Aug;32(8):364-72. PubMed PMID: 21752715. Pubmed Central PMCID: 3151350.
308. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jul;6(7):520-31. PubMed PMID: 16799471.
309. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct;3(10):781-90. PubMed PMID: 14523385.
310. Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Vitale M, Marcenaro E. TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol*. 2014;5:105. PubMed PMID: 24678311. Pubmed Central PMCID: 3958761.
311. Thielens A, Vivier E, Romagne F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol*. 2012 Apr;24(2):239-45. PubMed PMID: 22264929.
312. Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev*. 2010 May;235(1):267-85. PubMed PMID: 20536569. Pubmed Central PMCID: 2885032.
313. Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D. Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol*. 2013;4:69. PubMed PMID: 23518691. Pubmed Central PMCID: 3603285.
314. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren HG, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med*. 2005 Oct 3;202(7):1001-12. PubMed PMID: 16203869. Pubmed Central PMCID: 2213171.
315. Bryceson YT, Ljunggren HG, Long EO. Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood*. 2009 Sep 24;114(13):2657-66. PubMed PMID: 19628705. Pubmed Central PMCID: 2756125.
316. Krzewski K, Coligan JE. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol*. 2012;3:335. PubMed PMID: 23162553. Pubmed Central PMCID: 3494098.
317. Praper T, Sonnen A, Viero G, Kladnik A, Froelich CJ, Anderlueh G, et al. Human perforin employs different avenues to damage membranes. *J Biol Chem*. 2011 Jan 28;286(4):2946-55. PubMed PMID: 20889983. Pubmed Central PMCID: 3024789.
318. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev*. 2010 May;235(1):35-54. PubMed PMID: 20536554.
319. Rochel N, Cowan J. Negative cooperativity exhibited by the lytic amino-terminal domain of human perforin: implications for perforin-mediated cell lysis. *Chemistry & biology*. 1996 Jan;3(1):31-6. PubMed PMID: 8807825.
320. Voskoboinik I, Thia MC, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ, et al. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem*. 2005 Mar 4;280(9):8426-34. PubMed PMID: 15576364.
321. Ewen CL, Kane KP, Bleackley RC. A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ*. 2012 Jan;19(1):28-35. PubMed PMID: 22052191. Pubmed Central PMCID: 3252830.
322. Montel AH, Bochan MR, Hobbs JA, Lynch DH, Brahmi Z. Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell Immunol*. 1995 Dec;166(2):236-46. PubMed PMID: 7497525.

323. Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, et al. Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol*. 2001 Dec 15;167(12):6736-44. PubMed PMID: 11739488.
324. Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Nonstad U, Egeberg K, Sundan A, et al. Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine*. 1999 Sep;11(9):664-72. PubMed PMID: 10479402.
325. Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med*. 1999 Jan;5(1):90-6. PubMed PMID: 9883845.
326. Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Thomas L, Dikeakos JD, Thomas G, et al. Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Protein-induced Lysosomal Translocation of Proapoptotic Effectors Is Mediated by Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein-2 (PACS-2). *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Jul 13;287(29):24427-37. PubMed PMID: WOS:000306651100036. English.
327. Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *Journal of Immunology*. 1999 Nov 15;163(10):5358-66. PubMed PMID: WOS:000083638400025. English.
328. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, et al. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *Journal of Immunology*. 1999 Aug 15;163(4):1906-13. PubMed PMID: WOS:000081900200028. English.
329. Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *BioFactors*. 2010 Jul-Aug;36(4):274-88. PubMed PMID: 20623510.
330. Biron CA, Young HA, Kasaian MT. Interleukin 2-induced proliferation of murine natural killer cells in vivo. *J Exp Med*. 1990 Jan 1;171(1):173-88. PubMed PMID: 1688606. Pubmed Central PMCID: 2187657.
331. Fehniger TA, Bluman EM, Porter MM, Mrozek E, Cooper MA, VanDeusen JB, et al. Potential mechanisms of human natural killer cell expansion in vivo during low-dose IL-2 therapy. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(1):117-24. PubMed PMID: 10880055. Pubmed Central PMCID: 314354.
332. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*. 2003 May;3(5):413-25. PubMed PMID: 12766763.
333. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*. 1998 Nov;9(5):669-76. PubMed PMID: 9846488.
334. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med*. 1994 Oct 1;180(4):1395-403. PubMed PMID: 7523571. Pubmed Central PMCID: 2191697.
335. Pillet AH, Theze J, Rose T. Interleukin (IL)-2 and IL-15 have different effects on human natural killer lymphocytes. *Hum Immunol*. 2011 Nov;72(11):1013-7. PubMed PMID: 21925225.
336. Lum JJ, Schnepple DJ, Nie Z, Sanchez-Dardon J, Mbisa GL, Mihowich J, et al. Differential effects of interleukin-7 and interleukin-15 on NK cell anti-human immunodeficiency virus activity. *J Virol*. 2004 Jun;78(11):6033-42. PubMed PMID: 15141001. Pubmed Central PMCID: 415792.
337. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15 $\alpha$  recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity*. 2002 Nov;17(5):537-47. PubMed PMID: 12433361.
338. Kobayashi H, Dubois S, Sato N, Sabzevari H, Sakai Y, Waldmann TA, et al. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):721-7. PubMed PMID: 15367431.
339. Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yamauchi H, et al. IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J Immunol*. 1999 Feb 1;162(3):1662-8. PubMed PMID: 9973427.
340. Son YI, Dallal RM, Mailliard RB, Egawa S, Jonak ZL, Lotze MT. Interleukin-18 (IL-18) synergizes with IL-2 to enhance cytotoxicity, interferon-gamma production, and expansion of natural killer cells. *Cancer Res*. 2001 Feb 1;61(3):884-8. PubMed PMID: 11221875.
341. Mailliard RB, Alber SM, Shen H, Watkins SC, Kirkwood JM, Herberman RB, et al. IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med*. 2005 Oct 3;202(7):941-53. PubMed PMID: 16203865. Pubmed Central PMCID: 2213172.
342. Wong JL, Berk E, Edwards RP, Kalinski P. IL-18-primed helper NK cells collaborate with dendritic cells to promote recruitment of effector CD8+ T cells to the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2013 Aug 1;73(15):4653-62. PubMed PMID: 23761327. Pubmed Central PMCID: 3780558.
343. Hashimoto W, Osaki T, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Nagata S, et al. Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated

- primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J Immunol.* 1999 Jul 15;163(2):583-9. PubMed PMID: 10395644.
344. Kodama T, Takeda K, Shimozato O, Hayakawa Y, Atsuta M, Kobayashi K, et al. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. *European journal of immunology.* 1999 Apr;29(4):1390-6. PubMed PMID: 10229107.
  345. Loza MJ, Perussia B. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol.* 2004 Jan 1;172(1):88-96. PubMed PMID: 14688313.
  346. Trinchieri G, Santoli D. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J Exp Med.* 1978 May 1;147(5):1314-33. PubMed PMID: 650156. Pubmed Central PMCID: 2184280.
  347. Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, et al. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *Journal of immunology.* 2005 Jan 15;174(2):727-34. PubMed PMID: 15634892. Epub 2005/01/07. eng.
  348. Liang S, Wei H, Sun R, Tian Z. IFN $\alpha$  regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway. *Cytokine.* 2003 Sep 21;23(6):190-9. PubMed PMID: 12967644.
  349. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN- $\alpha$  beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol.* 2002 Oct 15;169(8):4279-87. PubMed PMID: 12370359.
  350. Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, et al. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN- $\alpha$ /beta. *European journal of immunology.* 2001 Nov;31(11):3138-46. PubMed PMID: 11745330. Epub 2001/12/18. eng.
  351. Stegmann KA, Bjorkstrom NK, Veber H, Ciesek S, Riese P, Wiegand J, et al. Interferon- $\alpha$ -induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 2010 May;138(5):1885-97. PubMed PMID: 20334827.
  352. Dunn C, Brunetto M, Reynolds G, Christophides T, Kennedy PT, Lampertico P, et al. Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *Journal of Experimental Medicine.* 2007 Mar 19;204(3):667-80. PubMed PMID: WOS:000245210800026. English.
  353. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:657-79. PubMed PMID: 16551262.
  354. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. CD56<sup>bright</sup> natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood.* 2003 Apr 15;101(8):3052-7. PubMed PMID: 12480696.
  355. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol.* 1999 Apr 15;162(8):4511-20. PubMed PMID: 10201989.
  356. Matikainen S, Paananen A, Miettinen M, Kurimoto M, Timonen T, Julkunen I, et al. IFN- $\alpha$  and IL-18 synergistically enhance IFN- $\gamma$  production in human NK cells: differential regulation of Stat4 activation and IFN- $\gamma$  gene expression by IFN- $\alpha$  and IL-12. *European journal of immunology.* 2001 Jul;31(7):2236-45. PubMed PMID: 11449378.
  357. Strengell M, Matikainen S, Siren J, Lehtonen A, Foster D, Julkunen I, et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN- $\gamma$  production in human NK and T cells. *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5464-9. PubMed PMID: 12759422.
  358. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 2010 Mar 18;115(11):2167-76. PubMed PMID: 19965656. Pubmed Central PMCID: 2844017.
  359. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset. *Blood.* 2001 May 15;97(10):3146-51. PubMed PMID: 11342442.
  360. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 2004 Jan;25(1):47-52. PubMed PMID: 14698284. Epub 2003/12/31. eng.
  361. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, et al. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev.* 2006 Dec;214:219-28. PubMed PMID: 17100887. Epub 2006/11/15. eng.
  362. Filipe-Santos O, Bustamante J, Chappier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN- $\gamma$ -mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol.* 2006 Dec;18(6):347-61. PubMed PMID: 16997570.

363. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol.* 1989 Nov 15;143(10):3183-91. PubMed PMID: 2530273.
364. Della Chiesa M, Vitale M, Carlomagno S, Ferlazzo G, Moretta L, Moretta A. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *European journal of immunology.* 2003 Jun;33(6):1657-66. PubMed PMID: 12778484.
365. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med.* 2002 Feb 4;195(3):343-51. PubMed PMID: 11828009. Pubmed Central PMCID: 2193591.
366. Nielsen N, Odum N, Urso B, Lanier LL, Spee P. Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A. *PLoS One.* 2012;7(2):e31959. PubMed PMID: 22384114. Pubmed Central PMCID: 3284517. Epub 2012/03/03. eng.
367. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008 Aug 1;112(3):461-9. PubMed PMID: 18650461. Pubmed Central PMCID: 2481557.
368. Moretta L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood.* 2010 Nov 11;116(19):3689-91. PubMed PMID: 21071612.
369. Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, Charrier S, et al. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood.* 2004 Nov 15;104(10):3267-75. PubMed PMID: 15242871.
370. Brilot F, Strowig T, Roberts SM, Arrey F, Munz C. NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15Ralpha. *J Clin Invest.* 2007 Nov;117(11):3316-29. PubMed PMID: 17948125. Pubmed Central PMCID: 2030458.
371. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 23;101(47):16606-11. PubMed PMID: 15536127. Pubmed Central PMCID: 534504. Epub 2004/11/13. eng.
372. Pallandre JR, Krzewski K, Bedel R, Ryffel B, Caignard A, Rohrlisch PS, et al. Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation. *Blood.* 2008 Dec 1;112(12):4420-4. PubMed PMID: 18682600. Pubmed Central PMCID: 2597118.
373. Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, Harris J, Vely F, Pende D, et al. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood.* 2007 May 1;109(9):3776-85. PubMed PMID: 17218381.
374. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med.* 2002 Feb 4;195(3):335-41. PubMed PMID: 11828008. Pubmed Central PMCID: 2193592. Epub 2002/02/06. eng.
375. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med.* 2002 Feb 4;195(3):327-33. PubMed PMID: 11828007. Pubmed Central PMCID: 2193595. Epub 2002/02/06. eng.
376. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 2003 Feb 1;170(3):1249-56. PubMed PMID: 12538683. Epub 2003/01/23. eng.
377. Amakata Y, Fujiyama Y, Andoh A, Hodohara K, Bamba T. Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Clin Exp Immunol.* 2001 May;124(2):214-22. PubMed PMID: 11422197. Pubmed Central PMCID: 1906048.
378. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, et al. The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *European journal of immunology.* 2004 Jun;34(6):1715-22. PubMed PMID: 15162442.
379. Nishioka Y, Nishimura N, Suzuki Y, Sone S. Human monocyte-derived and CD83(+) blood dendritic cells enhance NK cell-mediated cytotoxicity. *European journal of immunology.* 2001 Sep;31(9):2633-41. PubMed PMID: 11536161.
380. Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Sep;132(3):515-25; quiz 26. PubMed PMID: 23993353.
381. Groth A, Kloss S, von Strandmann EP, Koehl U, Koch J. Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance. *J Innate Immun.* 2011;3(4):344-54. PubMed PMID: 21576922.

382. Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, et al. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity*. 1999 Jun;10(6):661-71. PubMed PMID: 10403641.
383. Owen RE, Yamada E, Thompson CI, Phillipson LJ, Thompson C, Taylor E, et al. Alterations in receptor binding properties of recent human influenza H3N2 viruses are associated with reduced natural killer cell lysis of infected cells. *J Virol*. 2007 Oct;81(20):11170-8. PubMed PMID: 17670834. Pubmed Central PMCID: 2045558.
384. Cerboni C, Neri F, Casartelli N, Zingoni A, Cosman D, Rossi P, et al. Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Gen Virol*. 2007 Jan;88(Pt 1):242-50. PubMed PMID: 17170457.
385. Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology*. 2009 Sep;128(1):1-6. PubMed PMID: 19689730. Pubmed Central PMCID: 2747133.
386. Poggi A, Carosio R, Spaggiari GM, Fortis C, Tambussi G, Dell'Antonio G, et al. NK cell activation by dendritic cells is dependent on LFA-1-mediated induction of calcium-calmodulin kinase II: inhibition by HIV-1 Tat C-terminal domain. *J Immunol*. 2002 Jan 1;168(1):95-101. PubMed PMID: 11751951.
387. Slinger E, Langemeijer E, Siderius M, Vischer HF, Smit MJ. Herpesvirus-encoded GPCRs rewire cellular signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Jan 15;331(2):179-84. PubMed PMID: 20398729.
388. Slobedman B, Barry PA, Spencer JV, Avdic S, Abendroth A. Virus-encoded homologs of cellular interleukin-10 and their control of host immune function. *J Virol*. 2009 Oct;83(19):9618-29. PubMed PMID: 19640997. Pubmed Central PMCID: 2747999.
389. Born TL, Morrison LA, Esteban DJ, VandenBos T, Thebeau LG, Chen N, et al. A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *J Immunol*. 2000 Mar 15;164(6):3246-54. PubMed PMID: 10706717.
390. Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:861-926. PubMed PMID: 10837078.
391. Smith W, Tomasec P, Aicheler R, Loewendorf A, Nemcovicova I, Wang EC, et al. Human cytomegalovirus glycoprotein UL141 targets the TRAIL death receptors to thwart host innate antiviral defenses. *Cell Host Microbe*. 2013 Mar 13;13(3):324-35. PubMed PMID: 23498957. Pubmed Central PMCID: 3601332.
392. Jost S, Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:163-94. PubMed PMID: 23298212.
393. Colantonio AD, Bimber BN, Neidermyer WJ, Jr., Reeves RK, Alter G, Altfeld M, et al. KIR polymorphisms modulate peptide-dependent binding to an MHC class I ligand with a Bw6 motif. *PLoS Pathog*. 2011 Mar;7(3):e1001316. PubMed PMID: 21423672. Pubmed Central PMCID: 3053351.
394. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet*. 2007 Jun;39(6):733-40. PubMed PMID: 17496894.
395. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*. 2002 Aug;31(4):429-34. PubMed PMID: 12134147.
396. Boulet S, Sharafi S, Simic N, Bruneau J, Routy JP, Tsoukas CM, et al. Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS (London, England)*. 2008 Mar 12;22(5):595-9. PubMed PMID: 18317000.
397. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 2004 Aug 6;305(5685):872-4. PubMed PMID: 15297676.
398. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Perez R, Rodriguez M, Fdez-Morera JL, et al. Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2005 Jul 1;192(1):162-5. PubMed PMID: 15942906.
399. La D, Czarneski C, El-Gabalawy H, Kumar A, Meyers AF, Bastien N, et al. Enrichment of variations in KIR3DL1/S1 and KIR2DL2/L3 among H1N1/09 ICU patients: an exploratory study. *PLoS One*. 2011;6(12):e29200. PubMed PMID: 22216211. Pubmed Central PMCID: 3247251.
400. Aranda-Romo S, Garcia-Sepulveda CA, Comas-Garcia A, Lovato-Salas F, Salgado-Bustamante M, Gomez-Gomez A, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in severe A (H1N1) 2009 influenza infections. *Immunogenetics*. 2012 Sep;64(9):653-62. PubMed PMID: 22652695.
401. Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut*. 2011 Feb;60(2):268-78. PubMed PMID: 20876777.

402. Oliviero B, Varchetta S, Paudice E, Michelone G, Zaramella M, Mavilio D, et al. Natural killer cell functional dichotomy in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C virus infections. *Gastroenterology*. 2009 Sep;137(3):1151-60, 60 e1-7. PubMed PMID: 19470388.
403. Martins MA, Silva ML, Eloi-Santos SM, Ribeiro JG, Peruhype-Magalhaes V, Marciano AP, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine*. 2008 Feb 26;26(9):1173-84. PubMed PMID: 18243433.
404. Alter G, Teigen N, Davis BT, Addo MM, Suscovich TJ, Waring MT, et al. Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood*. 2005 Nov 15;106(10):3366-9. PubMed PMID: 16002429.
405. Alter G, Jost S, Rihn S, Reyor LL, Nolan BE, Ghebremichael M, et al. Reduced frequencies of NKp30+ NKp46+, CD161+, and NKG2D+ NK cells in acute HCV infection may predict viral clearance. *J Hepatol*. 2011 Aug;55(2):278-88. PubMed PMID: 21168454. Pubmed Central PMCID: 3729214.
406. Vidal SM, Khakoo SI, Biron CA. Natural killer cell responses during viral infections: flexibility and conditioning of innate immunity by experience. *Curr Opin Virol*. 2011 Dec;1(6):497-512. PubMed PMID: 22180766. Pubmed Central PMCID: 3237675.
407. Harrison RJ, Ettore A, Little AM, Khakoo SI. Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*. 2010 Aug;161(2):306-14. PubMed PMID: 20550548. Pubmed Central PMCID: 2909413.
408. Jost S, Reardon J, Peterson E, Poole D, Bosch R, Alter G, et al. Expansion of 2B4+ natural killer (NK) cells and decrease in NKp46+ NK cells in response to influenza. *Immunology*. 2011 Apr;132(4):516-26. PubMed PMID: 21214542. Pubmed Central PMCID: 3075505.
409. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CF, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. *Virology*. 2006 Feb 5;345(1):22-30. PubMed PMID: 16278000. Epub 2005/11/10. eng.
410. Silva ML, Espirito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhaes V, Caminha RC, et al. Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Jan;17(1):118-26. PubMed PMID: 19906894. Pubmed Central PMCID: 2812091.
411. Werner JM, Heller T, Gordon AM, Sheets A, Sherker AH, Kessler E, et al. Innate Immune Responses in Hepatitis C Virus-Exposed Healthcare Workers Who Do Not Develop Acute Infection. *Hepatology*. 2013 Nov;58(5):1621-31. PubMed PMID: WOS:000326327600013. English.
412. Varchetta S, Mele D, Mantovani S, Oliviero B, Cremonesi E, Ludovisi S, et al. Impaired intrahepatic natural killer cell cytotoxic function in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2012 Sep;56(3):841-9. PubMed PMID: 22431186.
413. Lobigs M, Blanden RV, Mullbacher A. Flavivirus-induced up-regulation of MHC class I antigens; implications for the induction of CD8+ T-cell-mediated autoimmunity. *Immunol Rev*. 1996 Aug;152:5-19. PubMed PMID: 8930665.
414. Lobigs M, Mullbacher A, Lee E. Evidence that a mechanism for efficient flavivirus budding upregulates MHC class I. *Immunol Cell Biol*. 2004 Apr;82(2):184-8. PubMed PMID: 15061772.
415. Garcia G, Arango M, Perez AB, Fonte L, Sierra B, Rodriguez-Roche R, et al. Antibodies from patients with dengue viral infection mediate cellular cytotoxicity. *J Clin Virol*. 2006 Sep;37(1):53-7. PubMed PMID: 16787760. Epub 2006/06/22. eng.
416. Devignot S, Sapet C, Duong V, Bergon A, Rihet P, Ong S, et al. Genome-wide expression profiling deciphers host responses altered during dengue shock syndrome and reveals the role of innate immunity in severe dengue. *PLoS One*. 2010;5(7):e11671. PubMed PMID: 20652028. Pubmed Central PMCID: 2907396.
417. Sun P, Garcia J, Comach G, Vahey MT, Wang Z, Forshey BM, et al. Sequential waves of gene expression in patients with clinically defined dengue illnesses reveal subtle disease phases and predict disease severity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013 Jul;7(7):e2298. PubMed PMID: 23875036. Pubmed Central PMCID: 3708824.
418. de Azeredo EL, Kubelka CF, Albuquerque LM, Barbosa LS, Damasco PV, Avila CA, et al. Tissue factor expression on monocytes from patients with severe dengue fever. *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Dec 15;45(4):334-5. PubMed PMID: 20846886.
419. Halstead SB, Marchette NJ. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Dec;69(6 Suppl):5-11. PubMed PMID: 14740949.
420. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938;27:493-7.

421. WHO/TDR. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control -- New edition. World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf) downloaded in Oct 2<sup>nd</sup>, 2012.2009.
422. Hosmalin A, Lichtner M, Louis S. Clinical analysis of dendritic cell subsets: the dendritogram. *Methods Mol Biol.* 2008;415:273-90. PubMed PMID: 18370160. Epub 2008/03/29. eng.
423. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J.* 2011 Aug 31;30(17):3481-500. PubMed PMID: 21878991. Pubmed Central PMCID: 3181477.
424. de Araujo JM, de Filippis AM, Schatzmayr HG, de Araujo ES, Britto C, Cardoso MA, et al. Quantification of dengue virus type 3 RNA in fatal and non-fatal cases in Brazil, 2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 Sep;103(9):952-4. PubMed PMID: 19261315.
425. Allen JE, El-Deiry WS. Regulation of the human TRAIL gene. *Cancer Biol Ther.* 2012 Oct;13(12):1143-51. PubMed PMID: 22892844. Pubmed Central PMCID: 3469471.
426. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods.* 2004 Nov;294(1-2):15-22. PubMed PMID: 15604012. Epub 2004/12/18. eng.
427. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen v V, Wills B. Dengue. *The New England journal of medicine.* 2012 Apr 12;366(15):1423-32. PubMed PMID: 22494122.
428. Du Q, Jiao Y, Hua W, Wang R, Wei F, Ji Y, et al. Preferential depletion of CD2(low) plasmacytoid dendritic cells in HIV-infected subjects. *Cellular & molecular immunology.* 2011 Sep;8(5):441-4. PubMed PMID: 21516119.
429. Killian MS, Fujimura SH, Hecht FM, Levy JA. Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *AIDS (London, England).* 2006 Jun 12;20(9):1247-52. PubMed PMID: 16816552.
430. Tsai JJ, Jen YH, Chang JS, Hsiao HM, Noisakran S, Perng GC. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J Innate Immun.* 2011;3(5):530-40. PubMed PMID: 21335935. Epub 2011/02/22. eng.
431. Dillon SM, Friedlander LJ, Rogers LM, Meditz AL, Folkvord JM, Connick E, et al. Blood myeloid dendritic cells from HIV-1-infected individuals display a proapoptotic profile characterized by decreased Bcl-2 levels and by caspase-3+ frequencies that are associated with levels of plasma viremia and T cell activation in an exploratory study. *J Virol.* 2011 Jan;85(1):397-409. PubMed PMID: 20962079. Pubmed Central PMCID: 3014213.
432. Sharp TM, Gaul L, Muehlenbachs A, Hunsperger E, Bhatnagar J, Lueptow R, et al. Fatal hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with locally acquired dengue virus infection - New Mexico and Texas, 2012. *MMWR Morbidity and mortality weekly report.* 2014 Jan 24;63(3):49-54. PubMed PMID: 24452132.
433. Noisakran S, Onlamoon N, Hsiao HM, Clark KB, Villinger F, Ansari AA, et al. Infection of bone marrow cells by dengue virus in vivo. *Exp Hematol.* 2012 Mar;40(3):250-9 e4. PubMed PMID: 22193689. Pubmed Central PMCID: 3415316.
434. Ghosh M, Banerjee M, Das S, Chakraborty S. Dengue infection with multi-organ involvement. *Scand J Infect Dis.* 2011 Apr;43(4):316-8. PubMed PMID: 21128707.
435. Stary G, Klein I, Kohlhofer S, Koszik F, Scherzer T, Mullauer L, et al. Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood.* 2009 Oct 29;114(18):3854-63. PubMed PMID: 19690337. Epub 2009/08/20. eng.
436. Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, Hardy AW, Kruhlak MJ, Anderson SA, et al. Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 2;103(18):7000-5. PubMed PMID: 16632604. Pubmed Central PMCID: 1444883.
437. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:513-45. PubMed PMID: 24555472.
438. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Ennis FA. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Feb;48(2):222-9. PubMed PMID: 8447527.
439. Ubol S, Masrinoul P, Chaijaruwanich J, Kalayanaroj S, Charoensirisuthikul T, Kasisith J. Differences in global gene expression in peripheral blood mononuclear cells indicate a significant role of the innate responses in progression of dengue fever but not dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2008 May 15;197(10):1459-67. PubMed PMID: 18444802.
440. Becquart P, Wauquier N, Nkoghe D, Ndjoyi-Mbiguino A, Padilla C, Souris M, et al. Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. *BMC Infect Dis.* 2010;10:356. PubMed PMID: 21167041. Pubmed Central PMCID: 3013083.

441. Ubol S, Phuklia W, Kalayanarooj S, Modhiran N. Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. *J Infect Dis.* 2010 Mar 15;201(6):923-35. PubMed PMID: 20158392.
442. Hoang LT, Lynn DJ, Henn M, Birren BW, Lennon NJ, Le PT, et al. The early whole-blood transcriptional signature of dengue virus and features associated with progression to dengue shock syndrome in Vietnamese children and young adults. *J Virol.* 2010 Dec;84(24):12982-94. PubMed PMID: 20943967. Pubmed Central PMCID: 3004338.
443. Simmons CP, Popper S, Dolocek C, Chau TN, Griffiths M, Dung NT, et al. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2007 Apr 15;195(8):1097-107. PubMed PMID: 17357045.
444. Long HT, Hibberd ML, Hien TT, Dung NM, Van Ngoc T, Farrar J, et al. Patterns of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection. *J Infect Dis.* 2009 Feb 15;199(4):537-46. PubMed PMID: 19138155.
445. Orozco S, Schmid MA, Parameswaran P, Lachica R, Henn MR, Beatty R, et al. Characterization of a model of lethal dengue virus 2 infection in C57BL/6 mice deficient in the alpha/beta interferon receptor. *J Gen Virol.* 2012 Oct;93(Pt 10):2152-7. PubMed PMID: 22815273. Pubmed Central PMCID: 3541791.
446. Herbeuval JP, Boasso A, Grivel JC, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood.* 2005 Mar 15;105(6):2458-64. PubMed PMID: 15585654.
447. Riboldi E, Daniele R, Cassatella MA, Sozzani S, Bosisio D. Engagement of BDCA-2 blocks TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology.* 2009;214(9-10):868-76. PubMed PMID: 19577819. Epub 2009/07/07. eng.
448. Rodriguez-Madoz JR, Bernal-Rubio D, Kaminski D, Boyd K, Fernandez-Sesma A. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. *J Virol.* 2010 May;84(9):4845-50. PubMed PMID: 20164230. Pubmed Central PMCID: 2863727. Epub 2010/02/19. eng.
449. Gondois-Rey F, Dental C, Halfon P, Baumert TF, Olive D, Hirsch I. Hepatitis C virus is a weak inducer of interferon alpha in plasmacytoid dendritic cells in comparison with influenza and human herpesvirus type-1. *PLoS One.* 2009;4(2):e4319. PubMed PMID: 19183807. Pubmed Central PMCID: 2629532. Epub 2009/02/03. eng.
450. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet.* 2005 May;37(5):507-13. PubMed PMID: 15838506.
451. Wang L, Chen RF, Liu JW, Lee IK, Lee CP, Kuo HC, et al. DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS neglected tropical diseases.* 2011;5(1):e934. PubMed PMID: 21245921. Pubmed Central PMCID: 3014977.
452. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem.* 2005 Jun 24;280(25):23698-708. PubMed PMID: 15855154.
453. Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect Dis.* 2003 Nov;3(11):722-7. PubMed PMID: 14592603. Epub 2003/11/01. eng.
454. Tel J, Smits EL, Anguille S, Joshi RN, Figdor CG, de Vries IJ. Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood.* 2012 Nov 8;120(19):3936-44. PubMed PMID: 22966165.
455. Kumar-Sinha C, Varambally S, Sreekumar A, Chinnaiyan AM. Molecular cross-talk between the TRAIL and interferon signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002 Jan 4;277(1):575-85. PubMed PMID: 11677236.
456. Secchiero P, Gonelli A, Ciabattini G, Melloni E, Grill V, Rocca B, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) up-regulates cyclooxygenase (COX)-1 activity and PGE(2) production in cells of the myeloid lineage. *Journal of leukocyte biology.* 2002 Nov;72(5):986-94. PubMed PMID: 12429721. Epub 2002/11/14. eng.
457. Chehimi J, Papasavvas E, Tomescu C, Gekonge B, Abdulhaqq S, Raymond A, et al. Inability of plasmacytoid dendritic cells to directly lyse HIV-infected autologous CD4+ T cells despite induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Virol.* 2010 Mar;84(6):2762-73. PubMed PMID: 20042498. Pubmed Central PMCID: 2826047.

458. Kalb ML, Glaser A, Stary G, Koszik F, Stingl G. TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN-alpha-mediated antitumor reactivity. *J Immunol.* 2012 Feb 15;188(4):1583-91. PubMed PMID: 22231699.
459. Colisson R, Barblu L, Gras C, Raynaud F, Hadj-Slimane R, Pique C, et al. Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2010 Mar 18;115(11):2177-85. PubMed PMID: WOS:000275751400013. English.
460. Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, Hardy AW, Kruhlak MJ, Anderson SA, et al. Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006 May 2;103(18):7000-5. PubMed PMID: WOS:000237399900040. English.
461. Matsuda T, Almasan A, Tomita M, Tamaki K, Saito M, Tadano M, et al. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Gen Virol.* 2005 Apr;86(Pt 4):1055-65. PubMed PMID: 15784899. Epub 2005/03/24. eng.
462. Liao H, Xu J, Huang J. FasL/Fas pathway is involved in dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells. *J Med Virol.* 2010 Aug;82(8):1392-9. PubMed PMID: 20572077. Epub 2010/06/24. eng.
463. Mosquera JA, Hernandez JP, Valero N, Espina LM, Anez GJ. Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes. *Virology journal.* 2005;2:26. PubMed PMID: 15801983. Pubmed Central PMCID: 1082913.
464. Klomporn P, Panyasrivanit M, Wikan N, Smith DR. Dengue infection of monocytic cells activates ER stress pathways, but apoptosis is induced through both extrinsic and intrinsic pathways. *Virology.* 2011 Jan 20;409(2):189-97. PubMed PMID: 21047664.
465. Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res.* 2003 Mar;58(1):73-9. PubMed PMID: 12719009.
466. Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell.* 2009 Dec 24;139(7):1243-54. PubMed PMID: 20064371. Pubmed Central PMCID: 2824905. Epub 2010/01/13. eng.
467. Jiang D, Weidner JM, Qing M, Pan XB, Guo H, Xu C, et al. Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west nile virus and dengue virus infections. *J Virol.* 2010 Aug;84(16):8332-41. PubMed PMID: 20534863. Pubmed Central PMCID: 2916517. Epub 2010/06/11. eng.
468. Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 2007 Feb;88(Pt 2):365-75. PubMed PMID: 17251552.
469. Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol.* 2005 Jul;79(13):8004-13. PubMed PMID: 15956546. Pubmed Central PMCID: 1143737.
470. Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, et al. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol.* 2005 May;79(9):5414-20. PubMed PMID: 15827155. Pubmed Central PMCID: 1082737. Epub 2005/04/14. eng.
471. Morrison J, Laurent-Rolle M, Maestre AM, Rajsbaum R, Pisanelli G, Simon V, et al. Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLoS Pathog.* 2013 Mar;9(3):e1003265. PubMed PMID: 23555265. Pubmed Central PMCID: 3610674.
472. Vidalain PO, Azocar O, Yagita H, Rabourdin-Combe C, Servet-Delprat C. Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand. *J Immunol.* 2001 Oct 1;167(7):3765-72. PubMed PMID: 11564793.
473. Ehrlich S, Infante-Duarte C, Seeger B, Zipp F. Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine.* 2003 Dec 21;24(6):244-53. PubMed PMID: 14609566.
474. Balzarolo M, Karrich JJ, Engels S, Blom B, Medema JP, Wolkers MC. The transcriptional regulator NAB2 reveals a two-step induction of TRAIL in activated plasmacytoid DCs. *European journal of immunology.* 2012 Nov;42(11):3019-27. PubMed PMID: 22806638.
475. Hensley LE, Young HA, Jahrling PB, Geisbert TW. Proinflammatory response during Ebola virus infection of primate models: possible involvement of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunology letters.* 2002 Mar 1;80(3):169-79. PubMed PMID: 11803049.
476. Zeng J, Fournier P, Schirmacher V. Induction of interferon-alpha and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human blood mononuclear cells by hemagglutinin-

- neuraminidase but not F protein of Newcastle disease virus. *Virology*. 2002 May 25;297(1):19-30. PubMed PMID: 12083832.
477. Vidalain PO, Azocar O, Lamouille B, Astier A, Rabourdin-Combe C, Servet-Delprat C. Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J Virol*. 2000 Jan;74(1):556-9. PubMed PMID: 10590149. Pubmed Central PMCID: 111571. Epub 1999/12/10. eng.
478. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Sep;132(3):536-44. PubMed PMID: 23906377. Pubmed Central PMCID: 3775709.
479. Fadilah SA, Sahrir S, Raymond AA, Cheong SK, Aziz JA, Sivagengei K. Quantitation of T lymphocyte subsets helps to distinguish dengue hemorrhagic fever from classic dengue fever during the acute febrile stage. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999 Dec;30(4):710-7. PubMed PMID: 10928365.
480. Neves PC, Matos DC, Marcovistz R, Galler R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine*. 2009 Sep 18;27(41):5543-9. PubMed PMID: 19647065. Epub 2009/08/04. eng.
481. Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, Ghattas H, Asquith B, Worth A, et al. In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*. 2007 Jun;121(2):258-65. PubMed PMID: 17346281. Pubmed Central PMCID: 2265941.
482. Lutz CT, Karapetyan A, Al-Attar A, Shelton BJ, Holt KJ, Tucker JH, et al. Human NK cells proliferate and die in vivo more rapidly than T cells in healthy young and elderly adults. *J Immunol*. 2011 Apr 15;186(8):4590-8. PubMed PMID: 21402893. Pubmed Central PMCID: 3071442.
483. Sung JM, Lee CK, Wu-Hsieh BA. Intrahepatic infiltrating NK and CD8 T cells cause liver cell death in different phases of dengue virus infection. *PLoS One*. 2012;7(9):e46292. PubMed PMID: 23050007. Pubmed Central PMCID: 3458800.
484. Homchampa P, Sarasombath S, Suvatte V, Vongskul M. Natural killer cells in dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 1988 Dec;6(2):95-102. PubMed PMID: 3064759.
485. Shresta S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology*. 2004 Feb 20;319(2):262-73. PubMed PMID: 14980486.
486. Guabiraba R, Besnard AG, Marques RE, Maillet I, Fagundes CT, Conceicao TM, et al. IL-22 modulates IL-17A production and controls inflammation and tissue damage in experimental dengue infection. *European journal of immunology*. 2013 Jun;43(6):1529-44. PubMed PMID: 23505056.
487. Ishikawa E, Nakazawa M, Yoshinari M, Minami M. Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune response to influenza virus infection in mice. *J Virol*. 2005 Jun;79(12):7658-63. PubMed PMID: 15919918. Pubmed Central PMCID: 1143624.
488. Krzewski K, Gil-Krzewska A, Nguyen V, Peruzzi G, Coligan JE. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4672-83. PubMed PMID: 23632890. Pubmed Central PMCID: 3674668.
489. Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, Saftig P, et al. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood*. 2013 Aug 22;122(8):1411-8. PubMed PMID: 23847195.
490. Hotho DM, Kreefft K, Groothuismink ZM, Janssen HL, de Knecht RJ, Boonstra A. Natural killer cell activity and function in chronic HCV-infected patients during peg interferon and ribavirin: early effects of active substance use. *Antiviral Res*. 2013 Mar;97(3):347-55. PubMed PMID: 23291200.
491. Wang J, Li F, Zheng M, Sun R, Wei H, Tian Z. Lung natural killer cells in mice: phenotype and response to respiratory infection. *Immunology*. 2012 Sep;137(1):37-47. PubMed PMID: 22612500. Pubmed Central PMCID: 3449245.
492. Tomescu C, Duh FM, Lanier MA, Kapalko A, Mounzer KC, Martin MP, et al. Increased plasmacytoid dendritic cell maturation and natural killer cell activation in HIV-1 exposed, uninfected intravenous drug users. *AIDS (London, England)*. 2010 Sep 10;24(14):2151-60. PubMed PMID: 20647906. Pubmed Central PMCID: 3253656.
493. de-Oliveira-Pinto LM, Marinho CF, Povoia TF, de Azeredo EL, de Souza LA, Barbosa LD, et al. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PLoS One*. 2012;7(7):e38527. PubMed PMID: 22815692. Pubmed Central PMCID: 3398008. Epub 2012/07/21. eng.
494. Schreibelt G, Tel J, Sliepen KH, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, et al. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Oct;59(10):1573-82. PubMed PMID: 20204387.

495. Schmidt KN, Leung B, Kwong M, Zarembler KA, Satyal S, Navas TA, et al. APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol.* 2004 Jan 1;172(1):138-43. PubMed PMID: 14688319.
496. Pisegna S, Pirozzi G, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Palmieri G. p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells. *Blood.* 2004 Dec 15;104(13):4157-64. PubMed PMID: 15315972.
497. Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L, et al. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 6;101(27):10116-21. PubMed PMID: 15218108. Pubmed Central PMCID: 454174.
498. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LC, et al. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases of illness. *PLoS One.* 2012;7(12):e52215. PubMed PMID: 23284941. Pubmed Central PMCID: 3527385.
499. Suwannasaen D, Romphruk A, Leelayuwat C, Lertmemongkolchai G. Bystander T cells in human immune responses to dengue antigens. *BMC immunology.* 2010;11:47. PubMed PMID: 20854672. Pubmed Central PMCID: 2949776.
500. Fu XY, Yang BY, Huang JQ, Long XG, Wu CY. [IL-12-induced expression of TRAIL enhances the cytotoxicity of NK cells against Jurkat cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2012 Sep;28(9):926-9. PubMed PMID: 22980654.
501. Beltrame LM, Sell AM, Moliterno RA, Clementino SL, Cardozo DM, Dalalio MM, et al. Influence of KIR genes and their HLA ligands in susceptibility to dengue in a population from southern Brazil. *Tissue Antigens.* 2013 Dec;82(6):397-404. PubMed PMID: 24498996.
502. Garcia G, Del Puerto F, Perez AB, Sierra B, Aguirre E, Kikuchi M, et al. Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. *Hum Immunol.* 2011 Oct;72(10):904-7. PubMed PMID: 21762746. Epub 2011/07/19. eng.
503. Horowitz A, Stegmann KA, Riley EM. Activation of natural killer cells during microbial infections. *Front Immunol.* 2011;2:88. PubMed PMID: 22566877. Pubmed Central PMCID: 3342047.
504. Hershkovitz O, Rosental B, Rosenberg LA, Navarro-Sanchez ME, Jivov S, Zilka A, et al. NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J Immunol.* 2009 Aug 15;183(4):2610-21. PubMed PMID: 19635919. Pubmed Central PMCID: 2768489.
505. Muntasell A, Costa-Garcia M, Vera A, Marina-Garcia N, Kirschning CJ, Lopez-Botet M. Priming of NK cell anti-viral effector mechanisms by direct recognition of human cytomegalovirus. *Front Immunol.* 2013;4:40. PubMed PMID: 23440148. Pubmed Central PMCID: 3578278.
506. Saikh KU, Lee JS, Kissner TL, Dyas B, Ulrich RG. Toll-like receptor and cytokine expression patterns of CD56+ T cells are similar to natural killer cells in response to infection with Venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J Infect Dis.* 2003 Nov 15;188(10):1562-70. PubMed PMID: 14624383.
507. Song DZ, Liang Y, Xiao Q, Yin J, Gong JL, Lai ZP, et al. TRAIL is involved in the tumoricidal activity of mouse natural killer cells stimulated by Newcastle disease virus in vitro. *Anatomical record.* 2013 Oct;296(10):1552-60. PubMed PMID: 23959779.
508. Glassner A, Eisenhardt M, Kramer B, Korner C, Coenen M, Sauerbruch T, et al. NK cells from HCV-infected patients effectively induce apoptosis of activated primary human hepatic stellate cells in a TRAIL-, FasL- and NKG2D-dependent manner. *Lab Invest.* 2012 Jul;92(7):967-77. PubMed PMID: 22449797.
509. Shimoda S, Sumida K, Iwasaka S, Hisamoto S, Tanimoto H, Nomura H, et al. Interferon- alpha - Induced Changes to Natural Killer Cells Are Associated with the Treatment Outcomes in Patients with HCV Infections. *Hepatitis research and treatment.* 2013;2013:374196. PubMed PMID: 23997950. Pubmed Central PMCID: 3755421.
510. Milush JM, Lopez-Verges S, York VA, Deeks SG, Martin JN, Hecht FM, et al. CD56negCD16(+) NK cells are activated mature NK cells with impaired effector function during HIV-1 infection. *Retrovirology.* 2013;10:158. PubMed PMID: 24351015. Pubmed Central PMCID: 3892122.
511. Lee S, Watson MW, Flexman JP, Cheng W, Hammond T, Price P. Increased proportion of the CD56(bright) NK cell subset in patients chronically infected with hepatitis C virus (HCV) receiving interferon-alpha and ribavirin therapy. *J Med Virol.* 2010 Apr;82(4):568-74. PubMed PMID: 20166183.
512. Micco L, Peppia D, Loggi E, Schurich A, Jefferson L, Cursaro C, et al. Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2013 Feb;58(2):225-33. PubMed PMID: 23046671.
513. Allen JE, El-Deiry WS. Regulation of the human TRAIL gene. *Cancer biology & therapy.* 2012 Oct 1;13(12). PubMed PMID: 22892844. Epub 2012/08/16. Eng.

## **8 Anexos**

---

### **8.1 Anexo 1: Artigo científico com resultados incluídos na tese**

# Dengue Virus Activates Membrane TRAIL Relocalization and IFN- $\alpha$ Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells In Vitro and In Vivo

Mariana Gandini<sup>1</sup>, Christophe Gras<sup>2</sup>, Elzinandes Leal Azeredo<sup>1</sup>, Luzia Maria de Oliveira Pinto<sup>1</sup>, Nikaïa Smith<sup>3</sup>, Philippe Despres<sup>4</sup>, Rivaldo Venâncio da Cunha<sup>5</sup>, Luiz José de Souza<sup>6</sup>, Claire Fernandes Kubelka<sup>1,9</sup>, Jean-Philippe Herbeuval<sup>3,9\*</sup>

**1** Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **2** CNRS UMR 8147, Université Paris Descartes, Paris, France, **3** Chimie et Biologie, Nucléo(s)tidés et Immunologie Thérapeutique (CBNIT), CNRS UMR 8601 Université Paris Descartes, Paris, France, **4** Unité des Interactions moléculaires Flavivirus-Hôtes, Institut Pasteur, Paris, France, **5** Departamento de Clínica Médica, FM, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, **6** Centro de Referência em Dengue, Campos de Goytacases, Brazil

## Abstract

**Background:** Dengue displays a broad spectrum of clinical manifestations that may vary from asymptomatic to severe and even fatal features. Plasma leakage/hemorrhages can be caused by a cytokine storm induced by monocytes and dendritic cells during dengue virus (DENV) replication. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are innate immune cells and in response to virus exposure secrete IFN- $\alpha$  and express membrane TRAIL (mTRAIL). We aimed to characterize pDC activation in dengue patients and their function under DENV-2 stimulation *in vitro*.

**Methods & Findings:** Flow cytometry analysis (FCA) revealed that pDCs of mild dengue patients exhibit significantly higher frequencies of mTRAIL compared to severe cases or healthy controls. Plasma levels of IFN- $\alpha$  and soluble TRAIL are increased in mild compared to severe dengue patients, positively correlating with pDC activation. FCA experiments showed that *in vitro* exposure to DENV-2 induced mTRAIL expression on pDC. Furthermore, three dimension microscopy highlighted that TRAIL was relocalized from intracellular compartment to plasma membrane. Chloroquine treatment inhibited DENV-2-induced mTRAIL relocalization and IFN- $\alpha$  production by pDC. Endosomal viral degradation blockade by chloroquine allowed viral antigens detection inside pDCs. All those data are in favor of endocytosis pathway activation by DENV-2 in pDC. Coculture of pDC/DENV-2-infected monocytes revealed a dramatic decrease of antigen detection by FCA. This viral antigens reduction in monocytes was also observed after exogenous IFN- $\alpha$  treatment. Thus, pDC effect on viral load reduction was mainly dependent on IFN- $\alpha$  production

**Conclusions:** This investigation characterizes, during DENV-2 infection, activation of pDCs *in vivo* and their antiviral role *in vitro*. Thus, we propose TRAIL-expressing pDCs may have an important role in the outcome of disease.

**Citation:** Gandini M, Gras C, Azeredo EL, Pinto LMdO, Smith N, et al. (2013) Dengue Virus Activates Membrane TRAIL Relocalization and IFN- $\alpha$  Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells In Vitro and In Vivo. PLoS Negl Trop Dis 7(6): e2257. doi:10.1371/journal.pntd.0002257

**Editor:** Kenji Hirayama, Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Japan

**Received:** October 15, 2012; **Accepted:** April 28, 2013; **Published:** June 6, 2013

**Copyright:** © 2013 Gandini et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was financed by FIOCRUZ/CNRS Agreement, CNPq, FAPERJ, CAPES/COFECUB Program and Agence Nationale de la Recherche sur le Sida. MG is a PhD student financed by CNPq. NS is a PhD student partially financed by COFECUB. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

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

\* E-mail: jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr

<sup>9</sup> These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Dengue is the most important arthropod-borne emerging viral disease in tropical countries due to its high morbidity and risk of mortality [1]. For example, in Brazil, dengue is a major public health problem and about two million cases were reported during 2010–2012 [2]. Dengue virus (DENV) is a single-stranded RNA virus belonging to genus *Flavivirus* [3,4]. All DENV serotypes (DENV-1 to -4) may induce a broad spectrum of clinical manifestations from asymptomatic to severe clinical features, characterized by hemorrhagic manifestations and a shock syndrome [5,6,7]. High viral load may cause an exacerbated

cytokine production that plays a key role in the generation of important physiopathological processes [8,9]. Human monocytes/macrophages and dendritic cells are susceptible to viral replication [10,11,12,13] and can release soluble mediators involved in vascular permeability and plasma leakage besides coagulation disorders [14,15,16,17].

Dendritic cells link innate and adaptive immunity and play a key role in shaping effective immune responses. Two major subpopulations are described: myeloid or conventional dendritic cells (cDCs) and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) [18,19,20,21]. In contrast to cDCs, pDC are not found in homeostatic tissues but mainly in circulating blood and in lymphoid tissues [21,22,23].

## Author Summary

Dengue is an important endemic tropical disease to which there are no specific therapeutics or approved vaccines. Currently several aspects of pathophysiology remain incompletely understood. A crucial cellular population for viral infections, the plasmacytoid dendritic cells (pDCs) was analyzed in this study. The authors found an *in vivo* association between the activation state of pDCs and the disease outcome. Membrane TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) expressing pDCs, representing activated pDCs, were found in higher frequency in milder cases of dengue than severe cases or healthy individuals. Detection of antiviral cytokine interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) and soluble TRAIL positively correlated with pDC activation. Dengue virus (DENV) serotype-2 was able to directly activate pDCs *in vitro*. Under DENV stimulation TRAIL was relocalized from intracellular to pDC plasma membrane and IFN- $\alpha$  was highly produced. The authors suggest an endocytosis-dependent pathway for DENV-induced pDC activation. It is also highlighted here a role for exogenous IFN- $\alpha$  and pDCs in reducing viral replication in monocytes, one of DENV main target cells. These findings may contribute in the future to the establishment of good prognostic immune responses together with clinical manifestations/warning signs.

Despite being rare cells, pDCs produce up to 1,000-fold more IFN- $\alpha$  than other cell types in response to virus exposure [24]. Viral activation of pDCs can be regulated by either one of the two Toll-like receptors (TLR), TLR-7 or TLR-9 [25], which are considered to be the pattern recognition receptors (PRR) for RNA [26] and DNA [27], respectively. It has been shown that cDC are efficiently infected by DENV and that viral replication blocked cDC maturation [28,29]. However, unlike cDCs, it has been reported that pDCs are not supporting productive DENV replication [30]. Indeed, DENV can activate pDCs through cell endosomal activity and TLR-7 pathway [31]. Furthermore, dengue-infected patients had impaired pDC activation features. Indeed, absolute numbers of blood pDC were decreased [32,33] and low levels of serum IFN- $\alpha$  [34] were reported.

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a pro-apoptotic molecule, which induces death of cells that express its death receptors (DR), DR4 and DR5 [35,36]. Furthermore, IFN- $\alpha$  regulates TRAIL expression by several cell types [37]. Soluble or membrane TRAIL mediates apoptosis on cells that are selectively expressing DR4 and DR5, mainly killing virus-infected cells and leaving intact normal cells [38,39]. Additionally an antiviral role was proposed for TRAIL. DENV-infected monocytes and dendritic cells display reduced viral replication when TRAIL is exogenously administered [40]. Soluble TRAIL (sTRAIL) was found in sera from dengue patients [41], but mTRAIL role and expression by DENV-2 exposed pDC to has not been investigated yet.

In this report we studied pDC activation by DENV and its consequences on viral infection. The clinical study showed that during acute phase of DF, pDCs are activated characterized by TRAIL and IFN- $\alpha$  markers. Indeed, the more pDC are activated the less the disease is severe. We found that DENV-2 efficiently activated TRAIL expression and IFN- $\alpha$  production by pDC. The microscopy study revealed that TRAIL was intracellularly stocked in resting pDC and was relocalized to plasma membrane when pDC were exposed to DENV-2. Furthermore, we showed that pDC could decrease DENV infection in monocytes mainly due to the effects of IFN- $\alpha$  produced. Thus pDC activation constitutes a

host defense against DENV-2 infection strongly suggesting that these cells are likely benefiting the disease outcome.

## Materials and Methods

### Ethics statement

Experimental procedures with human blood have been approved by Necker Hospital Ethical Committees for human research and were done according to the European Union guidelines and the Declaration of Helsinki. Procedures were also approved by the ethical committee at Instituto de Pesquisas Clinicas Evandro Chagas, FIOCRUZ (CAAE 3723.0.000.009-08). All patients were informed of procedures and gave written consent.

### Patient and blood samples

Blood from HIV-1-seronegative blood bank donors was obtained anonymously from “Etablissement Français du Sang” (convention # 07/CABANEL/106), Paris, France. Forty three patients with confirmed dengue fever (Table 1) from two Brazilian

**Table 1.** Demographic information about the study population with dengue fever (DF)<sup>1</sup>.

| Characteristics   | DF $\pm$ WS    |      | Severe DF <sup>2</sup> |                  |
|---|----------------|------|------------------------|------------------|
|   |                | (N)  |                        | (N) <sup>3</sup> |
| Age (median years, 25–75%)                                  | 43, 26–58      | (33) | 42, 24–50              | (10)             |
| Sex (M:F; patient number)                                   | 14:19          |      | 5:5                    |                  |
| Fever   | 87%            | (31) | 90%                    | (10)             |
| Hospitalization   | 52%            | (31) | 100%                   | (8)              |
| Hemorrhagic manifestations (mucosal) <sup>4</sup>           | 16%            | (31) | 30%                    | (10)             |
| Constant vomits   | 8%             | (25) | 50%                    | (6)              |
| Persistent abdominal pain                                   | 8%             | (25) | 60%                    | (5)              |
| Hypotension <sup>5</sup>                                    | 4%             | (26) | 25%                    | (8)              |
| Effusions <sup>6</sup>                                      | 0%             | (33) | 40%                    | (10)             |
| Platelet counts ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) <sup>7</sup>  | 172 $\pm$ 37   | (33) | 40 $\pm$ 12            | (9)              |
| Thrombocytopenia ( $<50.000 \times 10^3/\text{mm}^3$ )      | 18%            | (33) | 78%                    | (9)              |
| Hematocrit  | 41 $\pm$ 1%    | (30) | 42 $\pm$ 2%            | (9)              |
| Hemoconcentration <sup>8</sup>                              | 33%            | (30) | 56%                    | (9)              |
| Previous dengue (IgG positive)                              | 79%            | (30) | 100%                   | (8)              |
| Rapid hematocrit increase and platelet decrease             | 13%            | (31) | 60%                    | (10)             |
| Leukocyte counts ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) <sup>7</sup> | 4028 $\pm$ 522 | (27) | 3818 $\pm$ 571         | (8)              |
| ALT (U) <sup>7</sup>  | 52 $\pm$ 10    | (23) | 2784 $\pm$ 2685        | (8)              |
| AST (U) <sup>7</sup>  | 73 $\pm$ 16    | (23) | 670 $\pm$ 611          | (9)              |

<sup>1</sup>Study population with 43 patients.

<sup>2</sup>DF  $\pm$  WS dengue fever without or with warning signs; **Severe DF**, dengue fever with severe clinical manifestations according to WHO criteria [43].

<sup>3</sup>Number of patients with the available information during hospitalization.

<sup>4</sup>Hemorrhagic manifestations (epistaxis, gingivorrhagia, metrorrhagia, bleeding after coughing).

<sup>5</sup>Postural hypotension with decrease in systolic arterial pressure in 20 mmHg in supine position or systolic arterial pressure  $<90$  mm Hg.

<sup>6</sup>Pleural, pericardial effusion or ascites.

<sup>7</sup>Average  $\pm$  standard error from minimal recorded platelet, leukocyte/maximal hematocrit counts/ALT or AST values.

<sup>8</sup>Elevated hematocrit (20% during course of illness and recovery; or  $>45\%$ , men and  $>41\%$ , women).

doi:10.1371/journal.pntd.0002257.t001

Health Centers at Campo Grande, MS and Campos de Goytacases, RJ, Brazil were studied. All patients presented clinical diagnosis of dengue infection.

### Criteria for dengue fever severity and laboratorial diagnosis

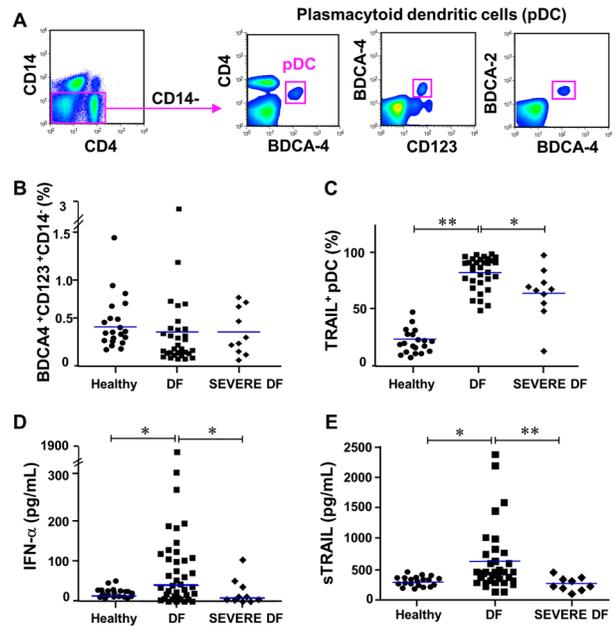
Dengue fever was considered mild when no warning signs (WS) or severe clinical manifestations were observed as follows. Dengue fever with WS was considered if patients presented any of the following warnings: (1) abdominal pain or tenderness; (2) persistent vomiting; (3) Clinical fluid accumulation; (4) mucosal bleeding; (5) lethargy; (6) liver enlargement more than 2 cm associated to laboratory parameters as increase in hematocrit (HCT) concurrent with rapid decrease in platelet counts (hemoconcentration or significant increase in hematocrit together with platelet counts bellow  $50,000/\text{mm}^3$ ). Severe DF was considered if patient displayed fever of 2–7 days plus any of the following: (1) Evidence of plasma leakage, such as high or progressively rising hematocrit evidenced by hemoconcentration; pleural effusions or ascites; circulatory compromise or shock (tachycardia, cold and clammy extremities, capillary refill time greater than three seconds, weak or undetectable pulse, narrow pulse pressure or, in late shock, unrecordable blood pressure); (2) Significant (internal) bleeding. [42,43]. Dengue virus infection was confirmed either by anti-dengue-IgM ELISA, serotype specific reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) or by virus isolation as described earlier [44]. Predominant serotypes was Dengue-2 identified in DF±WS (N = 10) and Severe DF (N = 3) but Dengue-1 was also identified in DF±WS patients (N = 6).

### Virus strain and viral stock

Dengue virus type 2 (strain Thailand/16681/1984) [45] was used for virus stock preparation as described elsewhere [46]. Briefly, *Aedes albopictus* cell clone C6/36 (CRL-1660, ATCC) were maintained at 28°C in Dulbecco's modified Eagle Medium (Gibco/Life Technologies, Foster City, CA, USA) with sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and supplemented with 5% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA), 1% penicillin-streptomycin-glutamine (Gibco), 0,5% non-essential amino acids (Gibco) and 10% tryptose phosphate broth (Sigma). C6/36 cell monolayers were infected with DENV-2 and cell culture supernatants were harvested 8 days later when cytopathic effect was observed. A purified DENV-2 stock was obtained by ultracentrifugation at 100,000 g for 1 h and set to a final volume 20 times smaller than initial (see also Fig. S1) [47,48]. Titration was performed in C6/36 cells using a standard TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose) assay as described elsewhere [49]. Uninfected flasks were maintained, also purified and used as negative control (MOCK). Infectivity of ultracentrifuged virus inoculum (UC) was comparable with the original C6/36 supernatant (SNDT) because infection rates obtained with the dilution 1/100 (UC) is similar to the dilution 1/5 (SNDT) as shown in Fig. S1.

### Human cell isolation

Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients or healthy donors were obtained from density gradient centrifugation of heparinized blood with lymphocyte separation medium (StemCell Technologies, Grenoble, FR). *In vitro* experiments were performed using fresh PBMC, which were obtained from blood bank donors and isolated as mentioned above. pDCs and monocytes were purified using Human plasmacytoid DC Negative Isolation Kit and Human CD14<sup>+</sup>



**Figure 1. TRAIL and IFN- $\alpha$  expression on dengue fever (DF) patients.** PBMCs from acute dengue fever patients were analyzed for mTRAIL expression on pDCs gated as CD14<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup> and BDCA-4<sup>+</sup> (A). (B) Blood pDC percentages and (C) mTRAIL expressing pDCs were assessed for healthy donors, DF and severe DF patients. (D) IFN- $\alpha$  and (E) Soluble TRAIL were analyzed by ELISA in plasma samples from healthy donors, DF and severe DF patients. Each dot represents one individual and median values are shown as blue bars. Data values were submitted to Mann-Whitney statistical test in which \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.005$ .  
doi:10.1371/journal.pntd.0002257.g001

monocytes Isolation Kit, respectively (StemCell Technologies). Cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone) and 1% penicillin-streptomycin-glutamine (Gibco) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> chamber according to protocol.

### PDC stimulation and coculture with monocytes

Freshly purified pDCs were cultured with DENV-2 at approximately MOI 4 to 20, mock for 18 hours (overnight). Chloroquine (Sigma-Aldrich) was used at 5  $\mu\text{M}$ /well and added before viral stimulation. Cells were harvested and assessed for pDC cell markers and membrane TRAIL expression or plated on coated slides for 3D microscopy. Supernatant was stored at -70°C for cytokine detection. Monocyte infection was performed as already described [46]. Briefly, freshly isolated monocytes were plated overnight followed by infection with DENV-2 at MOI 10, mock or not infected for 48 hours. Soluble human recombinant IFN- $\alpha$  (PBL International, Piscataway, NJ, USA) was added 18 hours before viral infection at 100 IU/mL. For autologous coculture assay, monocytes were cultured overnight in media, meanwhile pDCs were chloroquine-treated or not and then stimulated overnight with CpG A 2216 (InvivoGen, San Diego, CA, USA) at 5  $\mu\text{M}$  or DENV-2 at MOI 20, or not stimulated. Monocytes were then infected with DENV-2 (MOI 10) and pDCs were added at ratio 1:5 pDC/monocytes as explained in Fig. S2. Cells were harvested and assessed for intracellular DENV antigens.

## Flow cytometry

Antibodies for fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD123 or BDCA-2 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), Phycoerythrin (PE)-conjugated CD11c (IOtest/Beckman Coulter, Marseille, FR), Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-BDCA-4 (Miltenyi Biotec) and Allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7)-conjugated anti-CD14 (BD Biosciences, San Jose, CA), Vioblue-conjugated anti-CD4 (Miltenyi Biotec), V500 anti-CD3 (BD Biosciences) or with appropriate isotype-matched control antibodies (at 5 mg/mL each) in PBS containing 2% fetal bovine serum (Hyclone) and 2 mM EDTA (Gibco). Human PBMCs or isolated monocytes/pDCs were incubated for 20 min at 4°C with antibody cocktails. Cells were washed twice in ice-cold PBS and flow cytometry acquisition was performed on FACSCanto 7 colors or FACS Aria 13 colors flow cytometers using FACSDiva software (BD Biosciences). CD3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup>/BDCA-2<sup>+</sup> BDCA-4<sup>+</sup> gated cells were then tested for the expression of surface markers using PE-labeled anti-TRAIL (BD Biosciences). Mosquito C6/36 cell line monolayers were washed with PBS-1% bovine serum albumin (Sigma) and incubated for 60 min at 4°C with purified anti-DENV-complex (Millipore, Billerica, MA, USA) then 30 min with goat anti-mouse Alexafluor647 (Molecular Probes/Life Technologies) and fixed. Intracellular antigen staining for C6/36 or cocultures was performed using 2% paraformaldehyde (Sigma) followed by antibodies staining steps with 0.1% saponin (Sigma) buffer. Cells were analyzed by C6 Cytometer (Accuri/BD Biosciences). FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA) was used to analyze flow cytometry data.

## Three dimension (3D) microscopy and immunofluorescence

Cells were plated on poly-L-lysine (Sigma)-coated slides and then fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma), quenched with 0.1 M glycine (Sigma). Cells were blocked and incubated in permeabilizing buffer containing 0.1% saponin (Sigma) with mouse anti-TRAIL (clone RIK-2, eBioscience, San Diego, CA) or mouse anti-DENV (clone D3-2H2-9-21, Millipore). TRAIL and DENV staining were revealed using a secondary donkey anti-mouse IgG-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Nucleus was stained using DAPI (Molecular Probes/Life Technologies). Mounted slides were scanned with a Nikon Eclipse 90i Upright microscope (Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, The Netherlands) using a 100× Plan Apo VC piezo objective (NA 1.4) and Chroma bloc filters (ET-DAPI, ET-Cy3) and were subsequently deconvoluted with a Meinel algorithm and 8 iterations and analyzed using Metamorph (MDS Analytical Technologies, Warriner, UK). Overlays were: TRAIL or DENV/DAPI/Trans. ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) plugin 3D interactive surface plot was used on overlay stack on pDC stained with TRAIL or DENV/DAPI. Quantity of TRAIL and DENV-2 were determined using the measure and label plugin (ImageJ). C6/36 mosquito cell line were plated on slides and fixed with cold acetone. Mosquito cells were stained with mouse anti-DENV complex (Millipore) in PBS-1% bovine serum albumin (Sigma), washed twice with PBS. DENV E protein was revealed with goat anti-mouse Alexafluor488 (Molecular Probes/Life Technologies). Slides were mounted with ProLong Gold with DAPI (Molecular Probes/Life Technologies) and visualized at Evosfl Microscope (AMG, Bothell, WA, USA).

## Cytokine detection

Supernatants of pDCs/monocytes or cocultures in presence of DENV-2 or negative controls as well as acute phase plasma from

dengue patients were tested for multispecies soluble IFN- $\alpha$  by ELISA (PBL International) according to the manufacturer's instructions. Plasma samples were also tested for soluble TRAIL by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

## Statistical analysis

Experiments were repeated at least four times. P values (*P*) were determined using a two-tailed Student's *t* test for *in vitro* data and nonparametric Mann-Whitney test for patient data. *P*<0.05 was considered statistically significant. Univariate distributions of flow cytometric data were performed by probability binning, in 300 bins using FlowJo software [50].

## Results

### Dengue patients differentially exhibit TRAIL<sup>+</sup> pDCs, soluble IFN- $\alpha$ and TRAIL levels

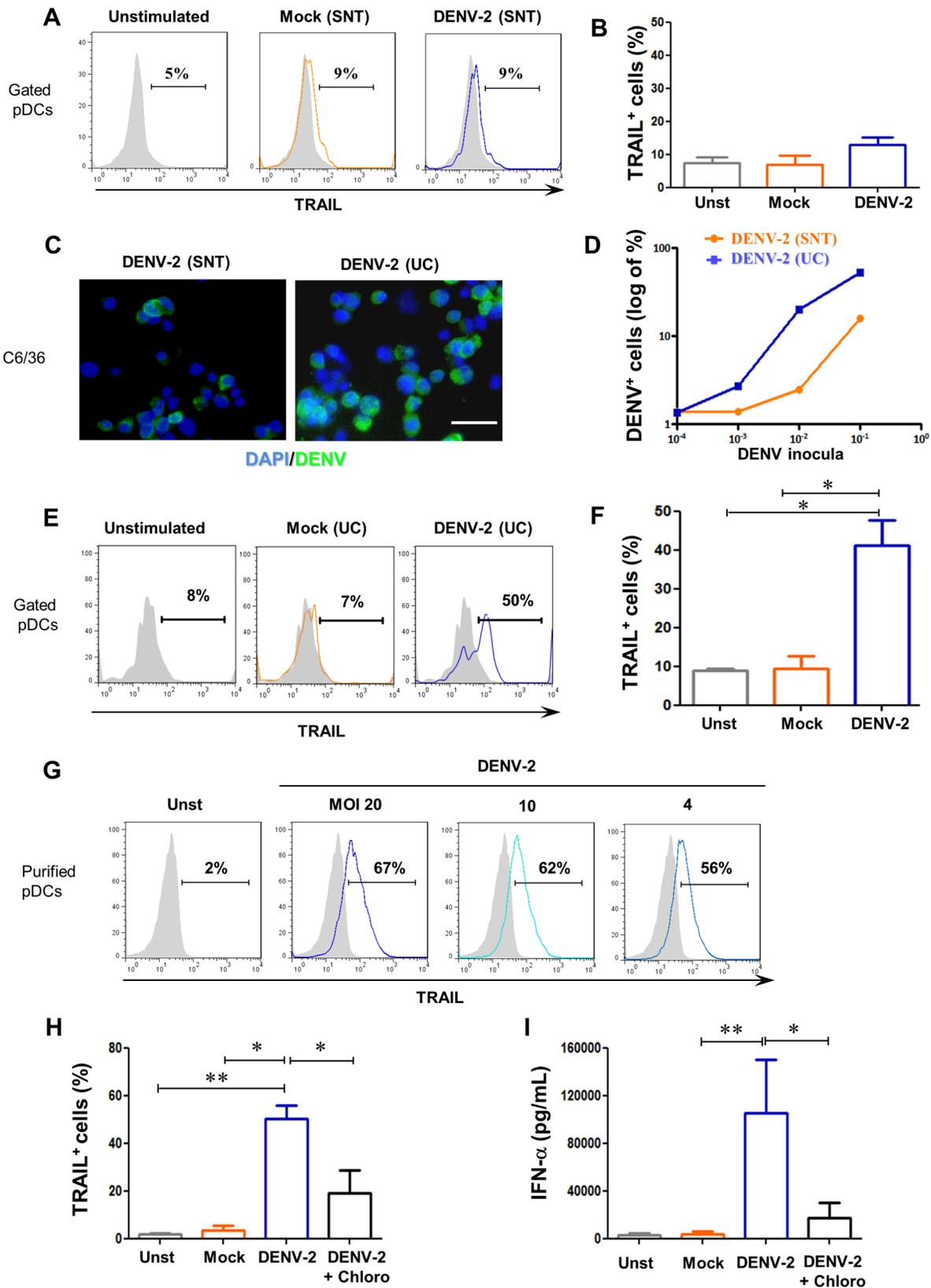
We studied a cohort of DENV infected patients and classified them regarding the severity of the disease. Detailed demographic, clinical, and laboratorial data from dengue patients are summarized in Table 1. From 43 patients enrolled, 10 were classified as severe DF and the remaining as DF including those with warning signs for severity (WS), according to latest WHO classification [42,43]. In order to explore pDC activation by DENV infection, we first characterized the CD4<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/BDCA-2/4<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup> pDC frequency/profile in 40 patients compared to 20 healthy controls (figure 1A).

As described by others [51], pDC frequencies in healthy individuals range from 0.2% to 0.8% of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). We observed no significant differences in pDC frequencies among healthy donors, DF $\pm$ WS patients or Severe DF patients (figure 1B). We then observed that mTRAIL expression on pDC was increased in DF $\pm$ WS patients compared to healthy controls or severe DF cases (figure 1C). Therefore, pDCs become activated in dengue patients with regard to mTRAIL expression.

Although pDCs are not the only IFN- $\alpha$  producers, activated pDCs can support a 1000-fold greater production of this factor than other cell types. We next sought a correlation of IFN- $\alpha$  with severity. Soluble IFN- $\alpha$  level in plasma samples from the studied population was determined by ELISA. Similarly to TRAIL<sup>+</sup> pDC frequency, we found that DF patients exhibit higher levels of IFN- $\alpha$  compared to healthy controls or Severe DF patients (figure 1D). Indeed, we found a positive correlation between IFN- $\alpha$  levels and TRAIL<sup>+</sup> pDCs (Spearman  $r=0.36$ ,  $p<0.05$ ). To further determine the IFN- $\alpha$  role, we quantified soluble TRAIL (sTRAIL) levels that is produced by immune cells and is induced by type I IFN. Similarly to previous data, DF $\pm$ WS patients displayed elevated sTRAIL in contrast to healthy controls or severe DF patients (figure 1E). Moreover, a strong positive correlation between TRAIL<sup>+</sup> pDCs and sTRAIL was determined (Spearman  $r=0.60$   $p<0.005$ ). pDC activation during dengue fever, elevated IFN- $\alpha$  and TRAIL levels is therefore associated with mild dengue fever.

### DENV-2 activates pDC leading to TRAIL display at cell surface and IFN- $\alpha$ secretion

pDC activation by DENV-2 was shown to occur by TLR-7 stimulation after endocytosis [31] and this pathway was crucial for IKpDC transformation by HTLV-1 [48]. To assess pDC activation by DENV-2, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were stimulated overnight with virus. Initially, we observed that DENV-2 from mosquito cell line supernatant (SNT) promoted a trend, however not statistically



**Figure 2. Purified DENV-2-induced *in vitro* mTRAIL expression and IFN- $\alpha$  production by purified plasmacytoid dendritic cells.** PBMCs from healthy donors were stimulated overnight with DENV-2, mock or none (unstimulated). (A) mTRAIL expression profile on pDCs gated from PBMCs (overlay) and (B) mTRAIL positive pDCs for three donors induced by mock SNT (orange) or DENV-2 SNT (blue) using unstimulated (grey fill) pDCs as negative control. DENV positive C6/36 cells infected for 48 h with supernatant of DENV-2-infected C6/36 cells (DENV-2 SNT) or ultracentrifuged DENV-2 SNT (DENV-2 UC) as described in M&M and figure S1. (C) DENV antigens/AlexaFluor488 (green) and nucleus/DAPI (blue) of

C6/36 cells infected with DENV-2 SNT (left) and UC (right) at the same inocula dilution ( $10^{-3}$ ). (D) DENV positive C6/36 cells by flow cytometry in which cells were infected with SNT (orange) or UC (blue) DENV-2 inocula at different dilutions. PBMCs from healthy donors were stimulated overnight with DENV-2 UC, mock UC or none (unstimulated). (E) mTRAIL expression profile on pDCs gated from PBMCs (overlay) and (F) mTRAIL positive pDCs for four donors induced by mock UC (orange) or DENV-2 UC (blue) using unstimulated (grey fill) pDCs as negative control. Freshly purified pDCs were stimulated overnight with DENV-2 UC, mock UC or not (unstimulated). (G) TRAIL expression induced by different MOIs of DENV-2 UC (blue) using unstimulated cells (grey) as negative control. (H) Purified pDCs positive for mTRAIL expression and (I) IFN- $\alpha$  secretion by unstimulated (grey), mock UC (orange), DENV-2-UC-stimulated pDCs pre-treated (black) or not (blue) with chloroquine, for four donors. Values were submitted to paired t test in which \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.005$ .  
doi:10.1371/journal.pntd.0002257.g002

significant, in TRAIL detection on pDC surface after viral stimulation in PBMCs, compared to unstimulated or mock-stimulated pDCs (figure 2A and B). Thereafter, an ultracentrifugation of DENV-2 viral stock was performed in order to concentrate viral particles, increasing MOI (figure S1). The DENV-2 infectivity was assayed for both viral stocks by infecting the mosquito cell line C6/36 and comparing them in serial dilutions. Viral antigens were detected inside cells inoculated with concentrated DENV-2 (UC) as early as 48 hours and at higher frequencies than the non-concentrated supernatant indicating that the concentrated virus had enhanced replication rates and it was intracellularly present as detected by immunofluorescence microscopy and flow cytometry (figure 2C and D). This viral stock (DENV-2 UC) was therefore adopted for assessing DENV-2 induced pDC activation in all experiments described in the present work.

Therefore, using purified virus in PBMC cultures we observed an increase of mTRAIL detection (figure 2E and F) in  $41\% \pm 6\%$  of pDCs ( $CD4^+ CD14^- BDCA4^+ CD123^+$ ) compared with less than 10% TRAIL $^+$  pDCs on mock or unstimulated conditions ( $p < 0.05$ ). To exclude pDC bystander activation and to confirm that DENV-2 is directly inducing mTRAIL on pDCs, we assayed purified pDC for TRAIL and IFN- $\alpha$  production. Purified pDC were exposed to different multiplicities of infection (MOI) for DENV-2 and we observed an increased inoculum-dependency of mTRAIL detection by virus-activated pDCs (figure 2G). The mTRAIL displayed on cell surface was mostly blocked when pDCs were pre-treated with chloroquine, an endosomal blocker of TLR activation, supporting the concept of an endocytosis-TLR-dependent TRAIL activation (figure 2H). To further characterize DENV-2-induced activation of pDCs, we measured IFN- $\alpha$  production in purified pDC cultures supernatants. DENV-2-stimulated pDCs produced approximately 10,000-fold more IFN- $\alpha$  than mock-treated or not stimulated pDCs. Chloroquine pre-incubation abrogated most DENV-2-induced IFN- $\alpha$  production (figure 2I). These results confirm that DENV-2 is able to activate pDCs *in vitro* through endocytosis pathway, responding by TRAIL expression and IFN- $\alpha$  production.

### DENV-2 and TRAIL location within pDCs by 3-dimension microscopy

To better characterize DENV-2-activated pDCs, we analyzed them by 3-dimension (3D) microscopy. Focal plane analysis revealed the presence of intracellular TRAIL expression in unstimulated pDC (figure 3A, upper panels), confirming our cytometry data and our previous study [48]. Images also revealed some 'peripheral' TRAIL expression that did not seem to be localized in the cytoplasm but rather on the membrane (figure 3A, middle panels). TRAIL expression profile in DENV-2-stimulated pDC did not seem to differ from unstimulated cells, even if TRAIL appeared to be decreased in the cytoplasm at the expense of "peripheral" TRAIL (figure 3A, middle panels). However, it remained hard to distinguish between intracellular and membrane TRAIL profile expression in both conditions without the use of a membrane marker. The blocking of endosomal acidification by

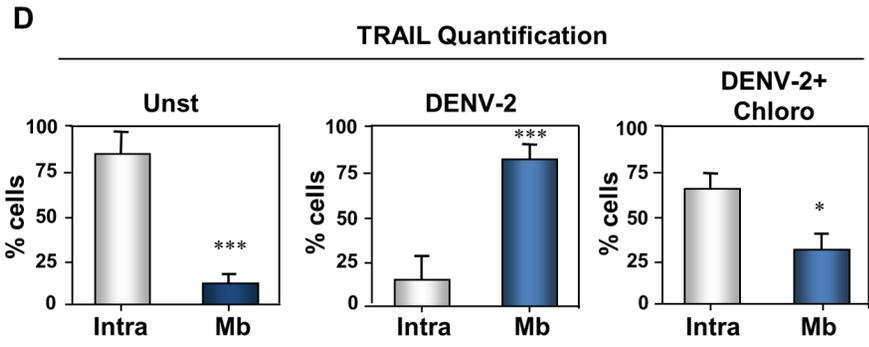
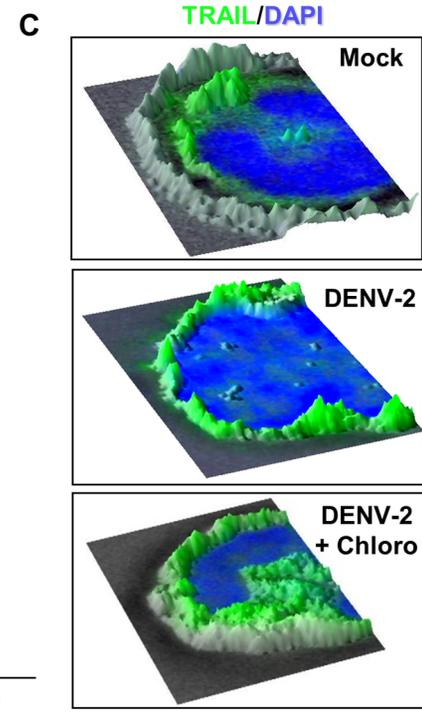
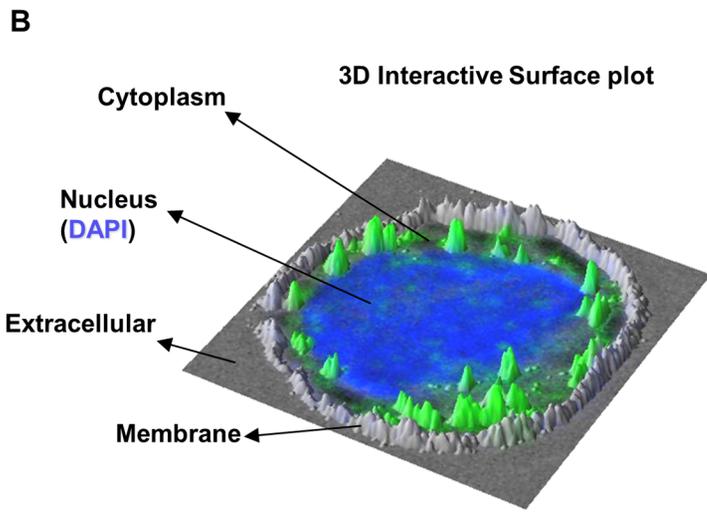
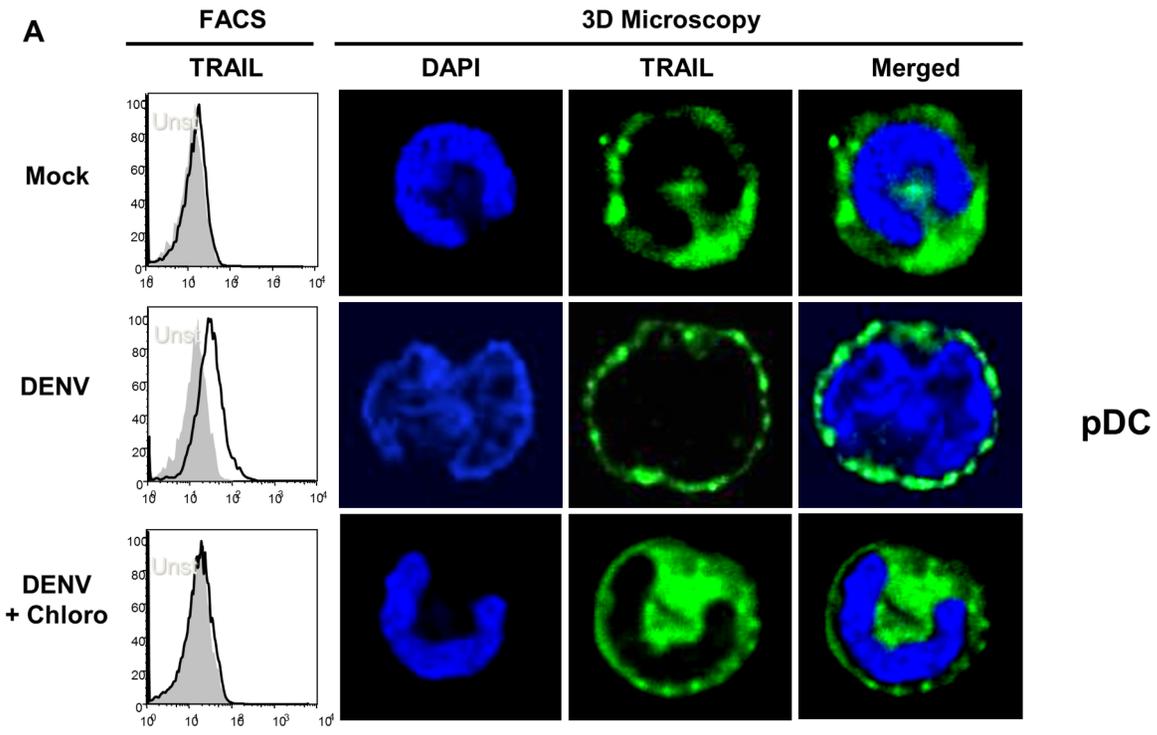
chloroquine use revealed the same profile as mock-stimulated pDCs.

Thus, to better characterize TRAIL localization in pDCs, 3D reconstruction (focal plan, XZ and YZ-stacks) analysis was performed (figure 3B–D). 3D interactive surface plot plugin of ImageJ software combined with phase contrast acquisition allowed us to visualize with precision internal or external localization of TRAIL (membrane delimitation) (figure 3B). This combined analysis clearly showed intracytoplasmic TRAIL repartition of mock stimulated pDC (figure 3B and C upper panel). DENV-2-stimulated pDC (figure 3C, middle panel) mainly harbored membrane TRAIL localization in contrast to the restrictive intracellular TRAIL expression of pDC from mock stimulated cells (figure 3A–B, right panels). The addition of the endocytosis-TLR pathway inhibitor chloroquine induced an intracellular blocking of TRAIL by DENV-2 exposed pDC. Quantification of membrane *vs.* intracellular TRAIL in pDC by 3D microscopy in independent assay sets demonstrates a clear shift from intracellular to membrane TRAIL location under DENV-2 exposure (figure 3D). We observed that almost all mock stimulated pDCs express only intracellular TRAIL. Chloroquine-treatment of DENV-2-stimulated pDC cultures prevented most TRAIL membrane co-localization on pDCs. Considered together, these results demonstrate that DENV-2 induces TRAIL relocalization from intracellular compartment to pDC plasma membrane.

We also attempted to detect virus inside pDCs by 3D microscopy. Because virus is rapidly degraded in endosomes by acid-activated proteases, we analyzed DENV-2 localization as early as 2 hours of viral stimulation. Focal plane images revealed that DENV-2 envelope protein was detected in close proximity to pDC periphery. In contrast, DENV-2 seemed to be intracellular in chloroquine treated pDC (figure 4A, upper panel). However, after overnight culture, DENV-2 labeling was exclusively detected in chloroquine-treated cells (figure 4A, lower panel). As described above for TRAIL detection, a 3D interactive surface plot analysis was performed and clearly showed that DENV-2 was co-localized in the cell membrane after 2 hours of stimulation (figure 4B, upper panel). We did not detect any virus in pDCs, suggesting a complete viral degradation within lysosomes either overnight (figure 4B, middle panel) or after a 2 hour-stimulation. However, DENV-2 particles were detected inside chloroquine-treated pDCs, indicating that chloroquine would probably neutralize acid proteases allowing viral antigen detection within most pDCs (figure 4B, lower panel and 4C). Therefore, within the same stimulus, pDCs exhibit TRAIL relocalization at the time point when no virus was detected, supporting our data for endosomal activation of TRAIL pathway.

### DENV-2 infection is impaired in monocytes during coculture with activated pDCs

Because viral load is considered to be an important factor in dengue severity [8], we next studied the role of pDCs in viral replication. For that purpose, we used primary autologous human monocytes that allow efficient DENV-2 replication in order to



**Figure 3. TRAIL localization in DENV-2-activated pDCs by 3D microscopy analysis.** Freshly purified pDCs stimulated with DENV-2 pre-treated or not with chloroquine (Chloro), or mock infected. TRAIL expression was analyzed by flow cytometry or by a 3D microscope. **(A)** Membrane TRAIL flow cytometry profiles (left column) on pDC stimulated by different stimuli -mock, DENV-2 or DENV-2+Chloro overlaid by unstimulated (grey). Microscopic images from pDC cultured with the mock, DENV-2 or DENV-2+Chloro showing DAPI-colored nucleus, TRAIL staining (green) and overlay. **(B)** 3D interactive surface plots analysis of 3D microscopic image. Overlay of nucleus (blue), TRAIL (green) and phase contrast (grey) as seen in **(C)** for different stimuli: DENV-2-stimulated pDC (DENV-2) exhibits membrane TRAIL localization in contrast to DENV-2+Chloro or unstimulated, where TRAIL is detected only intracellularly. **(D)** Percentage of pDCs expressing intracellular TRAIL only (Intra) or on the membrane (Mb) is shown as percentage of total analyzed cells. Values were submitted to paired t test in which \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.0005$ . doi:10.1371/journal.pntd.0002257.g003

assess whether pDC could inhibit viral replication or not. Analysis of purified monocytes infected for 48 hours revealed in 2D microscopy a robust intracellular but not nuclear staining of DENV proteins (figure 5A, lower panel), consistent with flavivirus replication cycle [4]. Considering that pDCs produce high levels of IFN- $\alpha$  upon DENV-2 stimulation, we evaluated its antiviral effect. Monocytes that were pre-treated with IFN- $\alpha$  24 hours before DENV-2 incubation showed a great reduction in viral antigen detection compared to untreated cells (figure 5B). Quantification by microscopy of DENV-2 positive/negative cells showed that IFN- $\alpha$  treatment reduced by 80% ( $p < 0.001$ ) the number of DENV-2 positive cells (figure 5C) and the same reduction was observed by flow cytometry (figure 5D). We also observed a low production of IFN- $\alpha$  by DENV-infected monocytes and confirmed IFN- $\alpha$  on supernatants of monocytes pre-treated with the cytokine (figure S2). These data are supporting that IFN- $\alpha$  has a restricting antiviral role during DENV infection.

Thus, to determine the potential effect of pDC on DENV infection within monocytes, we cocultured pDCs with infected monocytes. First, we confirmed that viral antigens were only detected in monocytes during cocultures, as only CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DENV-2-infected monocytes display DENV antigens compared to CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> DENV-2-stimulated pDCs (figure 5E). To activate pDC in a non-viral way, we stimulated them with the TLR-9 agonist CpG, which was reported to induce IFN- $\alpha$  production and TRAIL expression by pDC [48]. DENV-2 detection on monocytes was significantly diminished when cells were incubated with CpG-stimulated pDCs including supernatants (figure 5F). Importantly, non-pre-activated pDCs also diminished DENV-2 infection in monocytes, although to lesser extent. Chloroquine, which is an inhibitor of TLR-9 pathway, blocked pDC activation and partially restored DENV<sup>+</sup> cell detection within monocytes. Indeed, IFN- $\alpha$  was highly detected in the cocultures of infected monocytes with CpG-activated pDCs compared to non-pre-activated pDCs (figure 5G). Chloroquine completely blocked IFN- $\alpha$  secretion, suggesting the more IFN- $\alpha$  produced by activated pDCs the less viral antigens are detected. These findings are strongly supportive for an important role for pDC on DENV replication in monocytes.

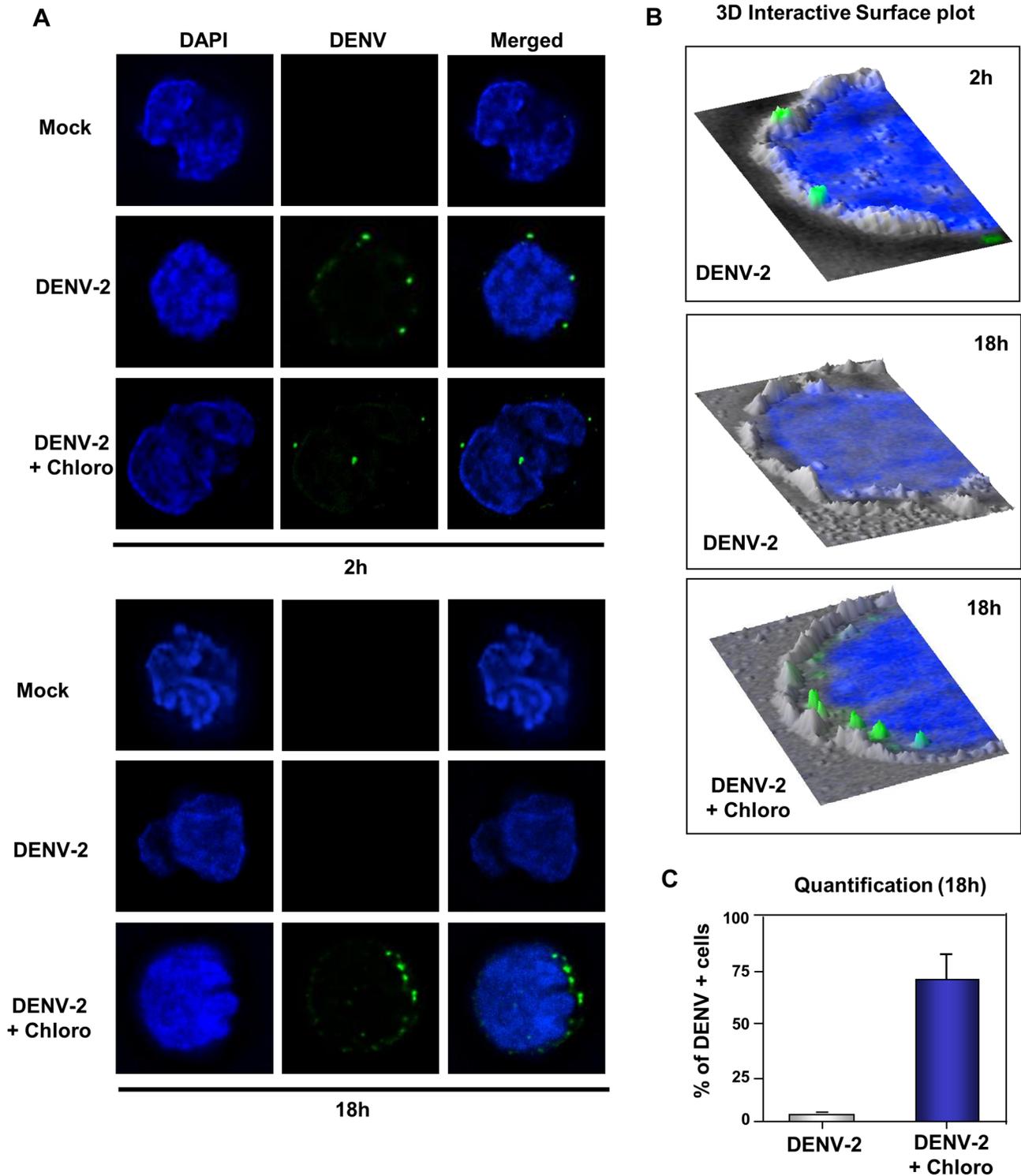
Finally, we also tested whether IKpDC-mediated apoptosis was involved in reduced DENV-2 detection in monocyte-pDC coculture. Monocytes were infected with DENV-2 or mock and then co-cultured with or without CpG-stimulated with or without pDCs (figure S3). After 48 hours of infection, cultures were collected and stained for AnnexinV and TOPRO3. We observed that the addition of unstimulated pDC to DENV-infected monocytes had no major impact on cell death during co-culture, remarkably, when compared to DENV only. Furthermore, CpG-activated pDCs addition caused an increase survival of monocyte during co-cultures, meanwhile reducing viral antigens. Therefore, we could rule out the killing effect of IKpDCs and once more attribute an antiviral role for IFN- $\alpha$  (and/or TRAIL) in the supernatant.

## Discussion

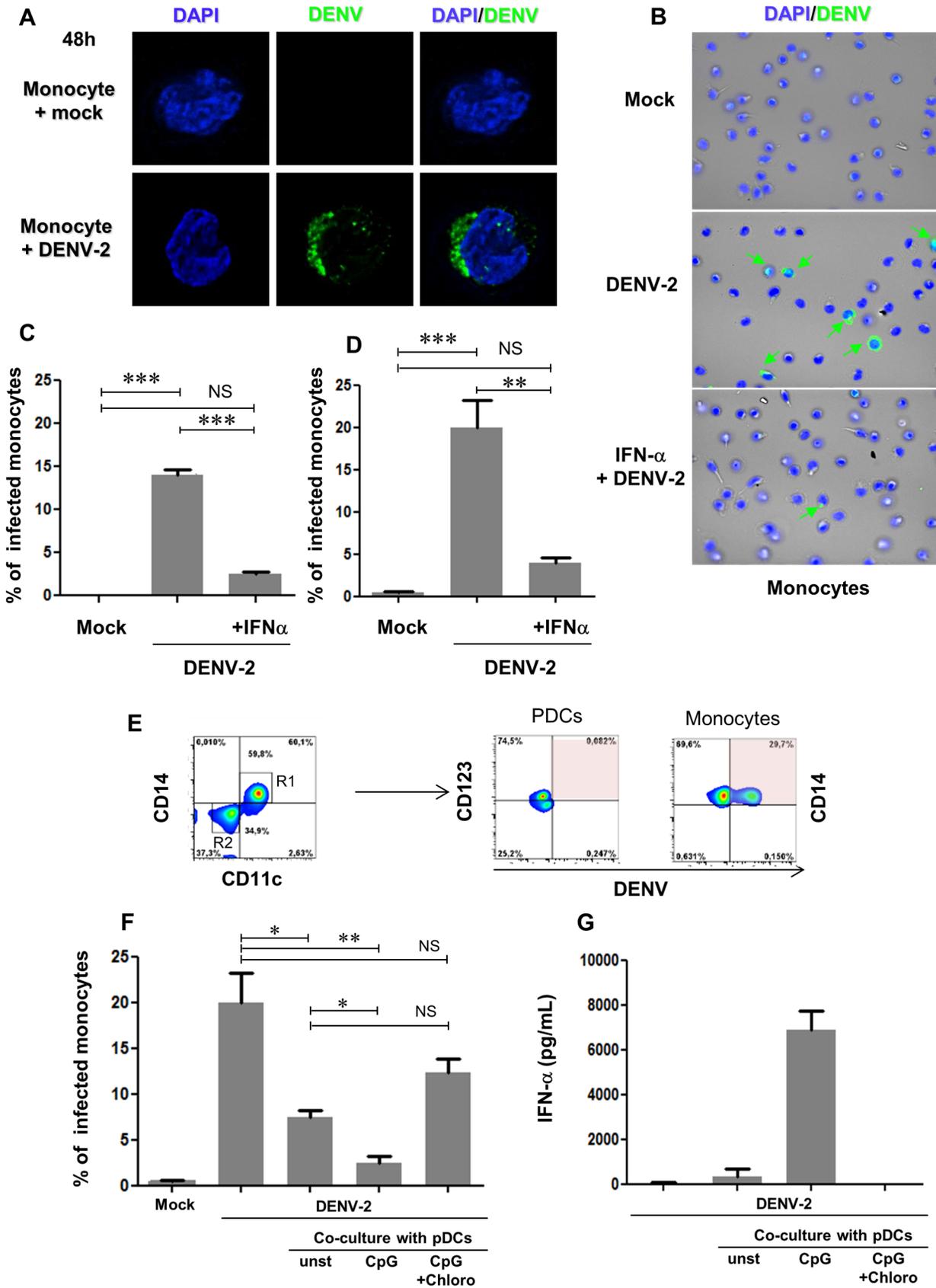
The present work describes features of pDC activation during DENV-2 infection and discusses its importance for disease outcome. We characterized, for the first time, an activated profile of pDCs from dengue patients using membrane TRAIL expression as a marker. Moreover, we observed that, *in vitro*, activated pDCs exerted an antiviral activity in infected human primary monocytes. Thus, pDCs may contribute to the control of viral clearance and to diminish the severity of the disease.

Upon challenge by viral particles, pDC activation takes place, characterized by upregulation of co-stimulatory markers, and by very high levels of IFN- $\alpha$  secretion [52]. Simultaneously to IFN production, we previously demonstrated that viral-activated pDC also expressed the pro-apoptotic ligand TRAIL on their membrane, which transforms them into IFN-producing Killer pDC (IKpDCs) [48,53,54]. For instance, in HIV-1 infection, the number of IKpDCs was correlated to CD4 depletion and disease progression [53]. However, the pDC function depends on the etiology of viral infection. During dengue disease, pDC activation by membrane TRAIL expression was found associated with less severe clinical manifestations. Other studies have also assessed blood pDCs from DENV-infected patients. Reduced absolute numbers of these cells were associated with a poor outcome, because severe cases of dengue disease exhibit a lower number of blood pDCs [32] and low levels of blood pDCs were correlated with high viral loads [33]. Nevertheless, treatment with TLR-3 and -7/8 agonists enhanced pDC activation and reduced viral replication in non-human primate model during DENV infection [55]. Supposedly, a blunted pDC response would allow viral replication to take place. Therefore, we also decided to characterize plasma levels of pDC-related cytokines.

Viral activation of pDC leads to production of IFN- $\alpha$ . Although pDC does not produce sTRAIL, pDC-produced IFN- $\alpha$  leads to production of soluble or membrane bound TRAIL by several cell types including monocytes [56]. Because IFN- $\alpha$  and TRAIL were reported to be antiviral *in vitro* for DENV, we analyzed the soluble levels in dengue patients. Indeed, plasma levels of both factors were statistically correlated with pDC activation in our cohort. Regarding blood cytokine levels in dengue patients, we find discrepancies in literature [9]. Inflammatory cytokines are increased in severe cases compared to mild forms. Even though, IFN- $\alpha$  was reported in DF and DF severe cases [57], Chen *et al.* detected higher IFN- $\alpha$  levels in DF compared to severe cases [34], supporting our data. Soluble TRAIL levels were not associated to severe forms but to febrile period and to primary infections [41]; however, we found a negative association between soluble TRAIL and severity. Because TRAIL is a downstream IFN stimulated gene, reduced IFN- $\alpha$  levels could explain low levels of soluble TRAIL in severe patients. Moreover, a weak type I IFN response in severe DF patients could represent a viral escape pathway. Others have reported that some viruses can evade TLR-induced IFN- $\alpha$  production, by inhibiting pDC function through the



**Figure 4. 3D microscopy of DENV-2 particles in purified plasmacytoid dendritic cells.** Freshly purified pDCs cultured with DENV-2 pre-treated or not with chloroquine (Chloro), or mock infected were stained with anti-DENV (green) and nucleus was colored with DAPI (blue). **(A)** pDC images (nucleus, virus and overlay) for mock, DENV-2 and chloroquine-treated plus DENV-2. Inhibition of endosomal acidification (chloroquine) allowed easier detection of DENV particles (DENV-2+Chloro at 2 h or 18 h stimulation). 2 h pDC incubation with DENV-2 was sufficient to detect viral proteins in contrast to the overnight (18 h) DENV-2-incubated pDCs when no virus was detected. **(B)** pDCs cultured with mock, DENV-2 or DENV-2+chloro were observed by 3D microscope. DENV staining (green) was merged with DAPI (blue)-colored nucleus and with phase contrast (grey). DENV particles were co-localized with pDC cell membrane at 2 h stimulation. Chloroquine allowed DENV-2 detection inside pDCs after 18 h of culture whereas DENV-2 alone did not. Panels shown microscopic images analyzed by 3D interactive surface plot. **(C)** Quantification of pDCs expressing DENV antigens without (DENV-2) and with chloroquine pre-treatment (DENV-2+Chloro) is shown as percentage of total analyzed cells. doi:10.1371/journal.pntd.0002257.g004



**Figure 5. IFN- $\alpha$  treatment and activated pDC coculture in DENV-2-infected monocytes.** Freshly purified monocytes were infected with DENV-2 (MOI 10) for 48 hours, pre-treated or not with IFN- $\alpha$ . **(A)** Nucleus/DAPI (blue) and virus (green) of monocytes mock- (upper panels) or DENV-2-infected (lower panels). Viral particles were detected in the cytoplasm only in DENV-2-infected monocytes. **(B)** Nucleus/DAPI (blue), virus (green) and phase contrast (grey) for different stimuli (mock – top, DENV-2 only – middle, IFN- $\alpha$ +DENV-2 – bottom) in monocytes. Green arrows show intracellular detection of DENV particles in DENV-2 infected monocytes, whereas pre-treatment with IFN- $\alpha$  strongly reduced viral antigen detection. Quantification of DENV antigens in mock, DENV-2 and IFN- $\alpha$  pre-treated DENV-2-infected monocytes using microscopy **(C)** or flow cytometry **(D)**. **(E)** Freshly purified monocytes were DENV-2-infected then immediately cocultured with DENV-2-stimulated pDCs. DENV antigen detection in CD14-CD11c-CD123+ pDCs or CD14+CD11c+ monocytes after 48 h of culture. Monocytes were DENV-2-infected then immediately cocultured with CpG-stimulated only (CpG), Chloroquine pre-treated CpG-stimulated (CpG+Chloro) or unstimulated (unst) pDCs (figure S2). Cocultures were analysed 48 h later for viral antigens **(F)** and IFN- $\alpha$  production **(G)**. Data represent independent experiments from two different donors and values were submitted to paired t test in which \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$  and \*\*\*  $p < 0.0005$ . doi:10.1371/journal.pntd.0002257.g005

binding to BDCA-2, a cell surface molecule that functions as IFN secretion inhibitor [58,59]. Indeed, BDCA-2 attachment can also abolish TRAIL-mediated cytotoxicity of pDCs [60]. It remains to be investigated whether DENV proteins can downregulate pDC function. This could explain why some patients respond efficiently to DENV infection and show high levels of IFN- $\alpha$  and sTRAIL, while others do not produce sufficient levels of the factors (severe cases). Furthermore, elevated numbers of activated pDCs could, by releasing high levels of IFN- $\alpha$ , protect target cells and activate other innate immunity actors, like Natural Killer cells that are associated with mild DF [61]. Therefore we suggest a protective role of activated pDCs during acute phase of dengue virus infection.

We asked whether pDCs could acquire IKpDC phenotype and have a protective role against DENV infection *in vitro*. DENV-2 induced IFN- $\alpha$  production and TRAIL relocalization from the intracellular compartment (in resting pDC) to pDC membrane (activated pDC) soon after viral exposure, supporting the idea of a rapid response to viruses. A high viral load was necessary to activate pDCs that was only achieved after a concentration procedure using ultracentrifugation protocols [47,48]. Although purification and ultra-centrifugation protocols may decrease infectious-to-particle ratio [62] our concentrated inoculum displayed improved infectious features. However, we cannot rule out that both non-infectious and infectious particles are activating pDCs in synergism, as it was shown for HIV. Indeed, infectious and AT-2-treated HIV (non-infectious) were both able to activate TLR-7 pathway in pDCs [63]. Apparently, it seems that pDCs need large quantities of virus to be activated or high frequency of viral receptor [64]. HTLV-1 also required high viral loads to activate IKpDCs [48]. Indeed, some discrepancies of IFN- $\alpha$  production by DENV-stimulated pDC are reported that may be result from using low viral loads [65] [66]. Flaviviruses may have acquired intrinsic mechanisms to avoid pattern recognition receptors [67] and consequently pDC activation.

To better elucidate pDC activation by DENV, we studied endocytosis pathway in pDC. Lysosomal acidification was crucial for TRAIL expression and IFN- $\alpha$  production by DENV-2 activated pDC. Another report showed that TLR-7 was the endosomal recognition receptor for DENV-2 by using specific inhibitors and acidification blockers [31] and that endocytosis pathway was crucial for co-stimulatory markers upregulation and IFN- $\alpha$  production [30]. Indeed, DENV-2 particles are detectable in pDC in the early stage (2 h) before viral degradation in lysosomes. However, after 18 h we did not detect viral antigens suggesting an absence of viral replication into pDC. Furthermore, lysosomal acidification impairment allowed detection of DENV-2 in pDC, contrasting with non-treated pDCs, suggesting that viruses are not disassembling. We did not observe an increase of non-structural protein 1 in culture supernatants (data not shown) after viral adsorption, supporting the incapacity for virus replication in pDCs. Our data is in accordance with others, as

low levels of replicative negative strand RNA were found inside pDCs [30]. Therefore, we suggest that DENV-2 particle sensing occurs in endosomal compartments. Recognition but not infection of DENV-2 is responsible for IKpDC activation, whereas it leads to TRAIL relocalization and IFN- $\alpha$  production.

We next wonder whether IKpDC and IFN- $\alpha$  could inhibit DENV-2 replication in human monocytes, one of main target cells for DENV. Type I interferon have a crucial role during innate immune responses inhibiting viral replication and spreading of many viruses [68]. Binding and activation of IFN receptors triggers transcription of interferon stimulated genes, which induce products that are able to inhibit several steps of virus replication [69]. We found that DENV-2 infection was strongly diminished by treatment with IFN- $\alpha$  in human monocytes. In accordance with these data, other reports demonstrated that pre-treatment of several susceptible cell lines with type I interferon blocked DENV-2 replication through a protein kinase R (PKR)-dependent mechanism [70,71,72]. Indeed, recently, several interferon-stimulated genes such as interferon-inducible trans-membrane (IFITM) proteins were able to inhibit dengue infection in cell lines [73,74]. However, type I interferon pathway is also subject to interference by many viruses that directly target pathways required for type I interferon response. Monocytes and monocyte-derived dendritic cells can produce IFN- $\alpha$  once they are infected by DENV, however at much lower levels compared to other viruses [66,75,76]. Moreover, several reports show degradation of downstream [77,78,79] and upstream [65,80] interferon signaling pathways by DENV non-structural proteins. Although DENV blocks type I IFN pathway, the cytokine still remains protective for other uninfected cells reducing viral spreading during infection as described by others [81].

In our study, infected monocytes co-cultured with IKpDCs displayed a dramatic reduction in viral load that could be partially reversed by lysosomal blockage. Viral detection was negatively related to IFN- $\alpha$  detection in cocultures of monocytes and pDCs. IKpDC activation may play an important role for a rapid viral clearance. TRAIL has been reported as a potential antiviral factor for DENV replication [40]. Because TRAIL expression and production by monocytes is induced by IFN- $\alpha$  [37], we tested several concentrations of recombinant TRAIL on monocytes, and we confirmed the antiviral function as published before [40]. However, membrane TRAIL blockage on IKpDC had minimal effect on viral load or apoptosis during cocultures (data not shown). Moreover, IKpDC had no significant effect on DENV-2-infected monocyte apoptosis, suggesting that the anti-viral effect of pDC is mainly due to IFN- $\alpha$  and/or TRAIL on viral replication and not to cell death. Although, both TRAIL and IFN- $\alpha$  were fundamental in reducing viral load in HIV-infected CD4+ T cell/ pDC co-cultures [82,83]. For DENV, type I interferon was sufficient to largely reduce viral infection rates. Therefore, because we could not demonstrate that IKpDCs have a role in killing infected monocytes, this population may modify the outcome of

the disease by producing massive quantities of IFN- $\alpha$  that would in turn block dengue replication in monocytes before adaptive immune responses ensues.

Finally, we showed in this work that DF patients harbored higher frequencies of circulating activated pDC and higher IFN- $\alpha$ /TRAIL levels compare to severe cases. DENV is activating pDC response in terms of IFN- $\alpha$  production and membrane TRAIL expression. We demonstrated that DENV mainly activates the endocytosis pathway and not the infection pathway, as we did not detect viral infection in pDC. Furthermore, our *in vitro* co-cultures data strongly support a crucial antiviral role for activated pDC and IFN- $\alpha$  by dramatically reducing viral spread. Even though, studies on DENV evasion from pDC response are still needed, we believe that pDC activation in patients' blood may contribute in the future to the establishment of good prognostic immune response together with clinical manifestations/warning signs.

## Supporting Information

**Figure S1 DENV-2 viral particles concentration by ultracentrifugation and infectivity assays on C6/36 mosquito cells.** C6/36 mosquito cell line was DENV-2 infected, supernatant were collected 10 days later and clarified by 1,000 g centrifugation. Cell-depleted supernatant was either stored (DENV-2 SNT) or ultracentrifuged at 100,000 g for 1 hour (DENV-2 UC) and stored (A). C6/36 cells were infected with equivalent dilutions (1–5 of SNT and 1–100 of UC) or not infected (mock) for 48 hours. (B) DENV envelope proteins (green) and DAPI-colored nucleus of C6/36 infected cells with equivalent dilutions of DENV-2 SNT and DENV-UC. White bar represents 25  $\mu$ m. (C) DENV antigens detected by flow cytometry of C6/36 infected with DENV-2 SNT (orange) and DENV-2 UC (blue) 48 h after infection. (D) DENV antigens extra- and intracellular detection in DENV-2-UC-infected C6/36 cells after viral adsorption (0 h) or at 48 hours (48 h) of infection. Overlay histograms for DENV-2 UC (blue) and uninfected cells (grey). (E) DENV positive C6/36 according to time of infection. All data represents one out of two independent experiments. (TIF)

## References

- Gubler DJ (2002) The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 33: 330–342.
- Brazilian-Health-Ministry (2012) VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Número de mortes por dengue reduz em 84% <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/5106/162/brasil-reduz-em-84-o-numero-%3Cbr%3Ede-mortes-por-dengue-em-2012.html>. Portal da Saúde Por Jorge Alexandre Araújo, da Agência Saúde – Ascom/MS.
- Lindenbach BD, Rice CM (2003) Molecular biology of flaviviruses. *Advances in virus research* 59: 23–61.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Micro* 3: 13–22.
- Gibbons RV, Vaughn DW (2002) Dengue: an escalating problem. *Bmj* 324: 1563–1566.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD (2009) Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 22: 564–581.
- Kyle JL, Harris E (2008) Global Spread and Persistence of Dengue. *Annual Review of Microbiology* 62: 71.
- Wang WK, Chen HL, Yang CF, Hsieh SC, Juan CC, et al. (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.
- Srikiatkachorn A, Green S (2010) Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol* 338: 67–82.
- Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, et al. (2005) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection. *BMC Infect Dis* 5: 64.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, et al. (2000) Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 6: 816–820.

**Figure S2 Monocytes and pDCs cocultures.** Freshly purified monocytes were infected with DENV-2 (MOI 10) for 48 hours, pre-treated or not with IFN- $\alpha$ . (A) IFN- $\alpha$  detection in DENV-2-infected pre-treated or not with IFN- $\alpha$  from three donors. (B) CD14+ purified monocytes were pre-treated or not with IFN- $\alpha$ , as pDCs were differently stimulated. After overnight incubation, monocytes were DENV-infected for 2 h, and then virus inoculum was removed. Whole pDCs cultures were added to infected monocytes during 48 h. DENV positive cells and IFN- $\alpha$  level were analyzed. (C) Isotypic DENV detection in CD14+ CD11c+ DENV-infected monocytes +CD14-CD11c-CD123+ DENV-activated pDCs after 48 h incubation. Data represents one out of two donors.

(TIF)

**Figure S3 Apoptosis assay on co-cultures of DENV-infected monocytes and pDCs.** Monocytes were infected with DENV-2 or mock and then co-cultured with or without CpG-stimulated with or without pDCs. After 48 hours of infection, cultures were collected and stained for AnnexinV (*y* axis) and TOPRO3 (*x* axis). Dot plots represent flow cytometry profiles for one representative donor.

(TIF)

## Acknowledgments

We thank Amanda Torrentes de Carvalho, Cintia Marinho, Débora Batista de Oliveira, Ana Rita Motta Castro for their assistance with patient recruitment and sample collection. We also thank Iris Peixoto Alvim and Geraldo Pereira for the help in the FACS Aria Facility, FIOCRUZ. We acknowledge Plinio Barcelar Laboratory, in Campos de Goytacazes, RJ for laboratory confirmation of dengue patients.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JPH CFK MG. Performed the experiments: MG CG LMOP NS ELA. Analyzed the data: MG CG JPH CFK NS RVdC LJdS ELA PD. Contributed reagents/materials/analysis tools: LMOP CFK RVdC LJdS PD. Wrote the paper: MG CFK JPH. Contributed with patient examination and sample collection: RVC IJS ELA LMOP.

- Halstead SB (1989) Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Reviews of infectious diseases* 11 Suppl 4: S830–839.
- Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, et al. (2008) Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology* 376: 429–435.
- Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG (2007) Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 85: 43–45.
- Luplertlop N, Misse D, Bray D, Deleuze V, Gonzalez JP, et al. (2006) Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep* 7: 1176–1181.
- Srikiatkachorn A (2009) Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thromb Haemost* 102: 1042–1049.
- Dalrymple NA, Mackow ER (2012) Endothelial cells elicit immune-enhancing responses to dengue virus infection. *J Virol* 86: 6408–6415.
- Steinman RM, Granelli-Piperno A, Pope M, Trumpheller C, Ignatius R, et al. (2003) The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 276: 1–30.
- Steinman RM (2011) Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annual review of immunology* 30: 1–22.
- Grouard G, Riscoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, et al. (1997) The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185: 1101–1111.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, et al. (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835–1837.

22. Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, Hardy AW, Kruhlak MJ, et al. (2006) Differential expression of IFN- $\alpha$  and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7000–7005.
23. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5: 1219–1226.
24. Swiecki M, Colonna M (2010) Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev* 234: 142–162.
25. Crozat K, Beutler B (2004) TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6835–6836.
26. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529–1531.
27. Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, et al. (2004) Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 34: 796–805.
28. Nightingale ZD, Patkar C, Rothman AL (2008) Viral replication and paracrine effects result in distinct, functional responses of dendritic cells following infection with dengue 2 virus. *J Leukoc Biol* 84: 1028–1038.
29. Palmer DR, Sun P, Celluzzi C, Bisbing J, Pang S, et al. (2005) Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *J Virol* 79: 2432–2439.
30. Sun P, Fernandez S, Marovich MA, Palmer DR, Celluzzi CM, et al. (2009) Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. *Virology* 383: 207–215.
31. Wang JP, Liu P, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW, et al. (2006) Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J Immunol* 177: 7114–7121.
32. Pichyangkul S, Endy TP, Kalayanaroj S, Nisalak A, Yongvanitchit K, et al. (2003) A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. *J Immunol* 171: 5571–5578.
33. De Carvalho Bittencourt M, Martial J, Cabie A, Thomas L, Cesaire R (2011) Decreased peripheral dendritic cell numbers in dengue virus infection. *J Clin Immunol* 32: 161–172.
34. Chen RF, Yang KD, Wang L, Liu JW, Chiu CC, et al. (2007) Different clinical and laboratory manifestations between dengue haemorrhagic fever and dengue fever with bleeding tendency. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 1106–1113.
35. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, et al. (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277: 818–821.
36. Wu GS, Burns TF, McDonald ER, 3rd, Jiang W, Meng R, et al. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature genetics* 17: 141–143.
37. Ehrlich S, Infante-Duarte C, Seeger B, Zipp F (2003) Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine* 24: 244–253.
38. Gura T (1997) How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science* 277: 768.
39. Cummins N, Badley A (2009) The TRAIL to viral pathogenesis: the good, the bad and the ugly. *Curr Mol Med* 9: 495–505.
40. Warke RV, Martin KJ, Giaya K, Shaw SK, Rothman AL, et al. (2008) TRAIL is a novel antiviral protein against dengue virus. *J Virol* 82: 555–564.
41. Becerra A, Warke RV, Martin K, Xhaja K, de Bosch N, et al. (2009) Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. *J Med Virol* 81: 1403–1411.
42. Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, et al. (2011) Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC Infect Dis* 11: 106.
43. WHO/TDR. (2009) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control – New edition. World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf) downloaded in Oct 2<sup>nd</sup>, 2012.
44. de Azeredo EL, Kubelka CF, Albuquerque LM, Barbosa LS, Damasco PV, et al. (2010) Tissue factor expression on monocytes from patients with severe dengue fever. *Blood cells, molecules & diseases* 45: 334–335.
45. Halstead SB, Marchette NJ (2003) Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *Am J Trop Med Hyg* 69: 5–11.
46. Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, et al. (2009) Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1091–1099.
47. Shrestha S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, et al. (2004) Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol* 78: 2701–2710.
48. Colisson R, Barblu L, Gras C, Raynaud F, Hadj-Slimane R, et al. (2010) Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 115: 2177–2185.
49. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, et al. (1997) Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol* 16: 204–208.
50. Roederer M, Treister A, Moore W, Herzenberg LA (2001) Probability binning comparison: a metric for quantitating univariate distribution differences. *Cytometry* 45: 37–46.
51. Hosmalin A, Lichtner M, Louis S (2008) Clinical analysis of dendritic cell subsets: the dendritogram. *Methods Mol Biol* 415: 273–290.
52. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V (2011) Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual review of immunology* 29: 163–183.
53. Hardy AW, Graham DR, Shearer GM, Herbeuval JP (2007) HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17453–17458.
54. Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, et al. (2006) Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology* 176: 248–255.
55. Sariol CA, Martinez MI, Rivera F, Rodriguez IV, Pantoja P, et al. (2011) Decreased dengue replication and an increased anti-viral humoral response with the use of combined Toll-like receptor 3 and 7/8 agonists in macaques. *PLoS One* 6: e19323.
56. Herbeuval JP, Boasso A, Grivel JC, Hardy AW, Anderson SA, et al. (2005) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood* 105: 2458–2464.
57. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, et al. (1993) High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 48: 222–229.
58. Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, Goode DJ, Macleod K, et al. (2007) HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3396–3401.
59. Xu Y, Hu Y, Shi B, Zhang X, Wang J, et al. (2009) HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells. *Molecular immunology* 46: 2640–2646.
60. Riboldi E, Daniele R, Cassatella MA, Sozzani S, Bosisio D (2009) Engagement of BDCA-2 blocks TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* 214: 868–876.
61. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, et al. (2006) NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol* 143: 345–356.
62. van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, et al. (2007) Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol* 81: 12019–12028.
63. Herbeuval JP, Hardy AW, Boasso A, Anderson SA, Dolan MJ, et al. (2005) Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13974–13979.
64. Barblu L, Machmach K, Gras C, Delfraissy JF, Boufassa F, et al. (2012) Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) From HIV Controllers Produce Interferon- $\alpha$  and Differentiate Into Functional Killer pDCs Under HIV Activation. *J Infect Dis* 206: 790–801.
65. Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, Patel JR, Savage T, et al. (2012) DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS pathogens* 8: e1002934.
66. Rodriguez-Madoz JR, Bernal-Rubio D, Kaminski D, Boyd K, Fernandez-Sesma A (2010) Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. *J Virol* 84: 4845–4850.
67. Munoz-Jordan JL, Fredericksen BL (2010) How flaviviruses activate and suppress the interferon response. *Viruses* 2: 676–691.
68. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, et al. (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews Drug discovery* 6: 975–990.
69. Wang BX, Fish EN (2012) The yin and yang of viruses and interferons. *Trends in immunology* 33: 190–197.
70. Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, et al. (2000) Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol* 74: 4957–4966.
71. Diamond MS, Harris E (2001) Interferon inhibits dengue virus infection by preventing translation of viral RNA through a PKR-independent mechanism. *Virology* 289: 297–311.
72. Hotta H, Hotta S, Homma M (1984) Effect of interferons on dengue virus multiplication in cultured monocytes/macrophages. *Biken J* 27: 189–193.
73. Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, et al. (2009) The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139: 1243–1254.
74. Jiang D, Weidner JM, Qing M, Pan XB, Guo H, et al. (2010) Identification of five interferon-induced cellular proteins that inhibit west Nile virus and dengue virus infections. *J Virol* 84: 8332–8341.
75. Reis SR, Sampaio AL, Henriques MG, Gandini M, Azeredo EL, et al. (2007) An in vitro model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 983–990.
76. Gandini M, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Freire Mda S, et al. (2011) Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and

- secretion of different TNF-alpha and IFN-alpha profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 594–605.
77. Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, Garcia-Sastre A (2009) NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J Virol* 83: 5408–5418.
  78. Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, et al. (2005) Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol* 79: 5414–5420.
  79. Mazzon M, Jones M, Davidson A, Chain B, Jacobs M (2009) Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation. *J Infect Dis* 200: 1261–1270.
  80. Yu CY, Chang TH, Liang JJ, Chiang RL, Lee YL, et al. (2012) Dengue virus targets the adaptor protein MITA to subvert host innate immunity. *PLoS pathogens* 8: e1002780.
  81. Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, et al. (2005) Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol* 174: 8163–8172.
  82. Machmach K, Leal M, Gras C, Viciano P, Genebat M, et al. (2012) Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *J Virol* 86: 4245–4252.
  83. Barblu L, Machmach K, Gras C, Delfraissy JF, Boufassa F, et al. (2012) Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) From HIV Controllers Produce Interferon-alpha and Differentiate Into Functional Killer pDCs Under HIV Activation. *J Infect Dis* 206: 790–801.

## **8.2 Anexo 2: Artigos científicos publicados no período**

# Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF- $\alpha$ and IFN- $\alpha$ profiles

Mariana Gandini<sup>1</sup>, Sonia Regina Nogueira Ignacio Reis<sup>1</sup>, Amanda Torrentes-Carvalho<sup>1</sup>, Elzinandes Leal Azeredo<sup>1</sup>, Marcos da Silva Freire<sup>2</sup>, Ricardo Galler<sup>2</sup>, Claire Fernandes Kubelka<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Viral, Instituto Oswaldo Cruz

<sup>2</sup>Departamento de Desenvolvimento Tecnológico, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos-Fiocruz,

Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*Flaviviruses cause severe acute febrile and haemorrhagic infections, including dengue and yellow fever and the pathogenesis of these infections is caused by an exacerbated immune response. Dendritic cells (DCs) are targets for dengue virus (DENV) and yellow fever virus (YF) replication and are the first cell population to interact with these viruses during a natural infection, which leads to an induction of protective immunity in humans. We studied the infectivity of DENV2 (strain 16681), a YF vaccine (YF17DD) and a chimeric YF17D/DENV2 vaccine in monocyte-derived DCs in vitro with regard to cell maturation, activation and cytokine production. Higher viral antigen positive cell frequencies were observed for DENV2 when compared with both vaccine viruses. Flavivirus-infected cultures exhibited dendritic cell activation and maturation molecules. CD38 expression on DCs was enhanced for both DENV2 and YF17DD, whereas OX40L expression was decreased as compared to mock-stimulated cells, suggesting that a T helper 1 profile is favoured. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  production in cell cultures was significantly higher in DENV2-infected cultures than in cultures infected with YF17DD or YF17D/DENV. In contrast, the vaccines induced higher IFN- $\alpha$  levels than DENV2. The differential cytokine production indicates that DENV2 results in TNF induction, which discriminates it from vaccine viruses that preferentially stimulate interferon expression. These differential response profiles may influence the pathogenic infection outcome.*

Key words: cytokines - dendritic cells - dengue virus - yellow fever vaccine - flavivirus

Flaviviruses are arthropod-borne viruses that may cause severe acute infectious diseases, such as dengue fever and yellow fever (YF). Dengue fever is the most important arthropod-borne emerging viral disease in tropical countries due to high morbidity and increased risk of mortality (Gubler 2002). The YF17DD vaccine induces long-lasting immunity, similar to wild viruses (Monath 2001, Halstead 2007). For dengue fever, a chimeric YF/dengue vaccine (ChimeriVax™ technology) is currently being tested in clinical trials (Guy et al. 2010). Both dengue and YF wild viruses can induce a broad spectrum of clinical manifestations from asymptomatic to severe clinical features, the latter of which is characterised by haemorrhagic manifestations and shock syndrome, which are associated with vascular permeability and leakage. Cytokines play a key role in the generation of these physiopathological processes (Geisbert & Jahrling 2004). Moreover, the occurrence of rare fatal cases and adverse clinical manifestations has been associated with the YF vaccine (Vasconcelos et al. 2001, Silva et al. 2010).

Several cytokines have been associated with disease severity in patients. For dengue fever, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (Hober et al. 1993, Braga et al. 2001), interleukin (IL)-10 (Green et al. 1999, Azeredo et al. 2001), IL-6 (Nguyen et al. 2004), macrophage inhibitory factor (Chen et al. 2006, Assuncao-Miranda et al. 2010) and interferon (IFN)- $\gamma$  (Bozza et al. 2008), among others (Srikiatkachorn & Green 2010), have been reported. Chemokines also have an important role in pathogenesis. For example, IP-10/CXCL-10 was found to be elevated in dengue haemorrhagic fever (DHF) (Fink et al. 2007) and MCP-1/CCL-2 (Lee et al. 2006), while MIP-1 $\beta$ /CCL-4 is associated with good prognosis (Bozza et al. 2008). Elevated serum levels of IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 receptor agonist (Ra) and IL-10 were observed in fatal YF cases when compared with non-fatal cases (Bae et al. 2008). Finally, in vaccinated individuals, high levels of IP-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 were detected (Querec et al. 2009, Silva et al. 2011).

Monocytes, macrophages and dendritic cells (DCs) are the main targets for viruses involved in vascular permeability induction (Schnittler & Feldmann 2003, Clyde et al. 2006). Mononuclear phagocytes become activated by virus, which induces synthesis and release of cytokines (e.g., TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha/\beta$  and IL-10) and chemokines (e.g., IL-8, MIP-1 $\alpha$  and MCP-1). These factors produced by in vitro infected cells are known to induce alterations in the endothelium, which leads to the imbalance of fluid between the intra and extra-vascu-

Financial support: IOC/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, DECICT/CNPq, FAPERJ, ICGEB

+ Corresponding author: [claire@ioc.fiocruz.br](mailto:claire@ioc.fiocruz.br)

Received 7 February 2011

Accepted 8 June 2011

lar areas of tissues and ultimately culminates in shock (Srikiatkachorn 2009). Coagulation features that occur during dengue fever may be linked to mononuclear phagocyte and endothelial cell activation because pro-inflammatory cytokines interfere with the activation of coagulation factors (Suharti et al. 2002).

After virus infection, DCs become activated and mature. During maturation processes, DCs usually upregulate co-stimulatory molecules, such as CD80, CD86, CD83, CD40, CD38 and OX40L (Quah & O'Neill 2005). These molecules may be involved in the polarisation of T helper (Th) cells into either Th-1 or Th-2 subsets. CD38, IFN- $\gamma$  and IL-12p70 are associated with Th-1 responses (Frasca et al. 2006). On the other hand, OX40L expression on DCs contributes to Th-2 polarisation (Delespesse et al. 1999). Mature DCs are able to activate T lymphocytes and drive the type of the immune response (Lanzavecchia & Sallusto 2004). It is believed that T cell activation in patients with severe dengue leads to T cell responses with less avidity for serotype-specific responses than mild dengue, resulting in a pathologic cytokine storm with limited antiviral responses (Duangchinda et al. 2010).

The aim of this investigation was to study the innate immune response induced in vitro by distinct flaviviruses. We selected a pathogenic strain of dengue virus (DENV) 2 (16681) originated from a DHFSE Asian case and the Brazilian YF17DD, which is known for its protective properties with minimal deleterious effects. A chimeric YF17D/DENV2 vaccine virus (Caufour et al. 2001) was assayed as well. We report for the first time that flaviviruses induce the expression of the DC maturation marker CD38 and downregulate OX40L, suggesting a Th-1-skewed response has been generated. Additionally, differential TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$  expression by DCs infected with DENV and vaccine YF17DD or 17D/DENV2 viruses are discussed, with regard to their possible influence on pathogenicity and virus clearance.

## MATERIALS AND METHODS

*Virus strain, cell cultures, virus stock preparation and titration* - DENV2 (strain Thailand/16681/1984) was provided by Dr SB Halstead (Naval Medical Research Centre, USA). YF strain 17DD is the live attenuated virus used in the YF vaccine manufactured by Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro (RJ), Brazil (Post et al. 1991). For virus stock preparation, Vero cells (CCL 81, ATCC) were maintained in 199 medium with Earle's salts buffered with sodium bicarbonate and supplemented with 5% foetal bovine serum (FCS) and antibiotics (Gibco, Invitrogen). Viral stock was prepared by flavivirus infection of a Vero cell monolayer in T175 flasks. When cytopathic effects were observed seven days later, the supernatant was harvested and supplemented with 30% FCS and aliquots were frozen at -70°C. Virus stock was titrated by serial dilution cultures in microtitre plates and detected by immunofluorescence as previously described (Miagostovich et al. 1993). An uninfected flask was also maintained and the supernatant was collected to be used as a mock inoculum. A mock infection was included in each experiment.

A set of experiments was performed using the chimeric virus YF/DENV2 strain 44/3. This virus contains the pre-M and E genes from DENV2 strain New Guinea C, with the carboxyl end of protein E (E261-E495 amino acids) that belongs to the Brazilian strain 44/2 (Caufour et al. 2001). This chimeric virus elicits a protective immune response against DENV challenge both in mice and Rhesus monkeys, which includes neutralising antibodies (Caufour et al. 2001, Galler et al. 2005).

Virus titre was calculated as 50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>/mL). However, when the virus was compared with the chimeric virus 44/3 (Fig. 1), all three viruses were titrated by the plaque-forming assay as described before (Galler et al. 2005).

*Human monocyte-derived DCs (MoDCs)* - Human peripheral blood was obtained from University Hospital Clementino Fraga Filho, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), RJ. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy donors' buffy coats by centrifugation on a density gradient (400 g for 30 min in Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences Corp), as described previously (Reis et al. 2007). Cells were resuspended at 10<sup>6</sup> cells/mL in Roosevelt Park Memorial Institute (RPMI) 1640 supplemented with 200 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin (Gibco, Invitrogen) and incubated at 37°C under a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The cells were then allowed to adhere to uncoated polystyrene flasks (150 cm<sup>3</sup>) for 90 min to enrich for monocytes. Non-adherent cells were gently removed by washing and the adherent cells were detached by mechanical cell harvesting with cell scrapers in cold cell culture medium. Cell viability was verified in the cultures by Trypan blue exclusion and was  $\geq 95\%$ . Enriched monocytes were suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 500 U/mL human rGM-CSF and 500 U/mL rIL-4 (Peprotech) and seeded at 1 x 10<sup>6</sup> cells/mL on 24-well plates (Nunc, Thermo Fisher Scientific). Cytokines were added every other day for six days. The appropriate phenotype of DC differentiation was confirmed before each experiment by flow cytometry.

*Infection of human MoDCs by flaviviruses* - After a six-day cell differentiation period, MoDCs were incubated with YF17DD, a dose equivalent to that used for DENV2 (2.5 x 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL), a dose five times more concentrated or cell culture supernatant as mock treatment diluted inoculum (500  $\mu$ L). This compensation for the infectivity of different flavivirus has also been previously reported (Youn et al. 2010). For experiments comparing the YF17DD, DENV2 and YF17D/DENV2 viruses, the multiplicity of infection (MOI) was 4 (4x10<sup>6</sup> plaque-forming unit/10<sup>6</sup> cells).

After three-hour incubation for adsorption at 37°C under humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, culture supernatants were replaced with medium containing 10% FCS and further incubated for 24-120 h. Each different parameter was set up in triplicate wells. After infection, supernatants were collected at defined intervals and stored at -70°C until cytokine measurement and cells were recovered for viral antigen and surface marker determination by flow cytometry.

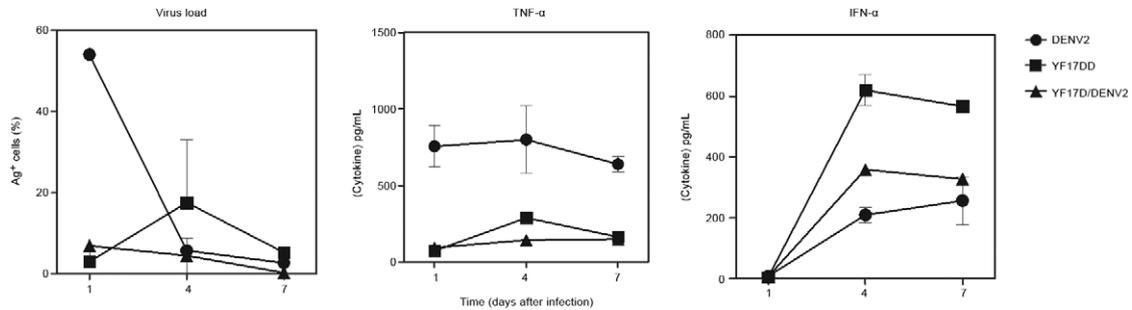


Fig. 1: viral antigen positive cells (Ag<sup>+</sup>), tumor necrosis factor (TNF)-α or interferon (IFN)-α production by monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after yellow fever (YF) 17DD/dengue virus 2 (DENV2) infections are compared to DENV2 or YF17DD infection. MoDCs were infected with YF17D/DENV2, DENV2 or YF17DD at multiplicity of infection 4 ( $4 \times 10^6$  plaque-forming unit/ $10^6$  cells). Cultures were incubated from one-seven days (X axis: time after infection; Y axis: percentage of viral Ag<sup>+</sup> cells obtained after flow cytometry analysis). TNF-α or IFN-α cell supernatant content are determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Mean and standard error from duplicates were plotted. Mock-infected cells were included for each donor, but no detectable TNF-α or IFN-α was recorded and viral Ag<sup>+</sup> cells were present at < 2% (data not shown). Data plotted were obtained from one representative peripheral blood mononuclear cells donor out of two independent performed experiments.

*Detection of viral antigen and specific co-stimulatory markers by flow cytometry in human MoDCs* - Cells were harvested by vigorous pipetting using cold wash buffer [phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma) and 0.1% sodium azide] and were resuspended at  $1 \times 10^6$  cells/microtube. The cells were then centrifuged (260 g, 7 min) and washed once more with wash buffer. Single or double cell labelling of infected and uninfected cultures was performed. For surface labelling, the cells were blocked with 5% heat-inactivated human plasma in wash buffer for 30 min at 4°C and further incubated for 30 min with anti-human CD1a-PE (Iotest Immunotech, Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA), DC-specific intercellular adhesion molecule-3-Grabbing non-integrin (DC-SIGN)-FITC (R&D Systems), CD14-PE (DakoCytomation), HLA-DR, DP, DQ-FITC (Dako Cytomation), CD80-FITC (Iotest Immunotech), CD38-FITC (Caltag, Invitrogen) or OX40L-PE (BD Biosciences Pharmingen). Matching isotype antibodies were used as negative controls. The cells were washed and subsequently fixed with 2% paraformaldehyde. Intracellular staining was performed according to previously described methods (Neves-Souza et al. 2005), with slight modifications. Briefly, the cells were fixed with cold 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min and, after centrifugation, the membranes were permeabilised with 0.15% saponin in wash buffer. The cells were blocked with 5% heat-inactivated human plasma in wash buffer for 30 min at 4°C. Primary monoclonal antibody incubation was performed with anti-Dengue Complex (Chemicon, Millipore, Billerica, MA, USA), anti-Yellow Fever (Biogenesis, AbD Serotec) or an isotype-matched antibody diluted in wash buffer containing 0.15% saponin for 60 min at 4°C. The cells were washed once with wash buffer and further incubated with secondary anti-mouse labelled with Alexa Fluor-488 (Molecular Probes, Invitrogen) for 30 min at 4°C. The cells were acquired (10,000 events for DC-SIGN positive gate) on a FACS-Calibur flow cytometer (BD Biosciences). Analysis was performed using FlowJo (TreeStar Inc, Ashland, OR, USA) or Summit (Dako Automation).

*Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for TNF-α* - ELISA plates (MaxiSorp, Nunc) were coated overnight at room temperature (RT) with 1 μg/mL at 100 μL/well of rabbit anti-human TNF-α antibody provided in the Human TNF-α ELISA Development Kit (Peprotech). The plates were washed with 0.05% Tween 20 (Sigma) in PBS and were incubated with 1% BSA in PBS at 250 μL/well for 90 min at RT. The samples and standards were added in duplicate at 100 μL/well and the plates were incubated overnight at 4°C. Subsequent incubation with 0.25 μg/mL at 100 μL/well of biotinylated detection antibody for TNF-α was performed for 120 min at RT. This procedure was followed by a 30-min incubation with streptavidin-peroxidase (Streptavidin, Zymed, Invitrogen) at 1:2,000 dilution with 100 μL/well. Tetramethylbenzidine (KPL Inc) was added and the plates were read at 630 nm after 15-min incubation.

*Cytokine detection in cell culture supernatant by multiplex microbead immunoassay* - A multiplex biometric immunoassay, which contains fluorescent microspheres conjugated with a monoclonal antibody specific for a target protein, was employed for cytokine and chemokine measurement according to the manufacturer's instructions (Upstate, Millipore) as described previously (Reis et al. 2007). Measured cytokines including the following: IFN-α, IL-6, IL-1Ra, IL-10, MCP-1/CCL-2, MIP-1β/CCL-4, IP-10/CXCL-10 and RANTES/CCL-5. Briefly, cell culture supernatants (50 μL) were incubated overnight at 4°C with pooled antibody-coupled beads in bottom filter plates (Millipore). The complexes were washed and incubated with pooled biotinylated detection antibodies for 90 min at RT. Then, streptavidin-phycoerythrin was added for 30 min at RT prior to assessing cytokine concentration titres. A broad range (1.95-8,000 pg/mL) of concentrated human recombinant cytokines, provided by the vendor, was used to establish standard curves to maximise assay sensitivity and dynamic range. Cytokine levels were determined with a multiplex array reader from Luminex Instrumentation System (Bio-Plex Workstation from Bio-Rad Laboratories). The analyte concentration was calculated by the software provided by the manu-

facturer (Bio-Plex Manager Software), which provided a regression analysis to derive the equation for cytokine concentration prediction in cell culture samples.

**Ethics** - Procedures performed in this work were approved by the Ethical Committee of the Fiocruz, Brazilian Health Ministry (recognised by the Brazilian National Ethics Committee) (111/00 and CAAE-0064.0.011.000-07).

**Statistical analyses** - Data were first tested for normality with Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software). Flow cytometry data exhibited normal distributions, while normality was not detected for cytokine and chemokine production. To determine whether there were significant differences in viral antigen expression, data values were subjected to one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test. Data from cytokine and chemokine assessments were submitted to a Wilcoxon signed rank test.

## RESULTS

**DENV2 and YF17DD infection kinetics in human MoDCs** - Considering that DCs have been described as targets for DENV and YF vaccines (Barba-Spaeth et al. 2005, Neves-Souza et al. 2005) we investigated these host-virus interactions in detail. MoDCs that originated from healthy human PBMC donors exhibited characteristic downregulation of CD14 ( $1.8 \pm 0.9\%$ ) and up-regulation of DC-SIGN ( $75 \pm 5\%$ ) and CD1a ( $54 \pm 6\%$ ). These cells expressed low levels of CD80 and less HLA-DR,P,Q than MoDCs that were stimulated with bacterial lipopolysaccharides and human IFN- $\gamma$  (data not shown). The MoDCs exhibit characteristics of immature DCs, which have the ability to perform endocytosis and capture antigens and are more susceptible to virus infection (Steinman & Nussenzweig 2002).

MoDC cultures were incubated with YF17DD vaccine virus at a dose either equivalent to that used for DENV2 ( $2.5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL) or with a dose five times more concentrated. Fig. 2A shows histograms obtained by flow cytometry analysis after intracellular viral antigen labelling, representing data from cells incubated with the three different inocula at 24 h after infection. Fig. 2B shows percentages of viral antigen-positive cell (Ag<sup>+</sup>) rates from 24-72 h post-infection (hpi). Both viruses were able to infect MoDCs, but higher inoculum doses of YF17DD were required to generate similar frequencies of infected cells compared with DENV2. The peak infection rate was detected at 24 hpi, although significant percentages were still detected at 48-72 hpi. Fig. 2C shows viral antigen detection in MoDCs originated from 11 different PBMC donors, confirming that DENV2 is significantly more infectious than YF17DD when the same MOI is used ( $p < 0.0001$ ). Cells cultured with mock or heat-inactivated inocula contained less than 0.5% positive labelled cells PBMC donors in all assays (data not shown).

Except when mentioned, the assays described below were performed using YF17DD at the higher MOI, which induced similar rates of cell infection when compared to DENV2.

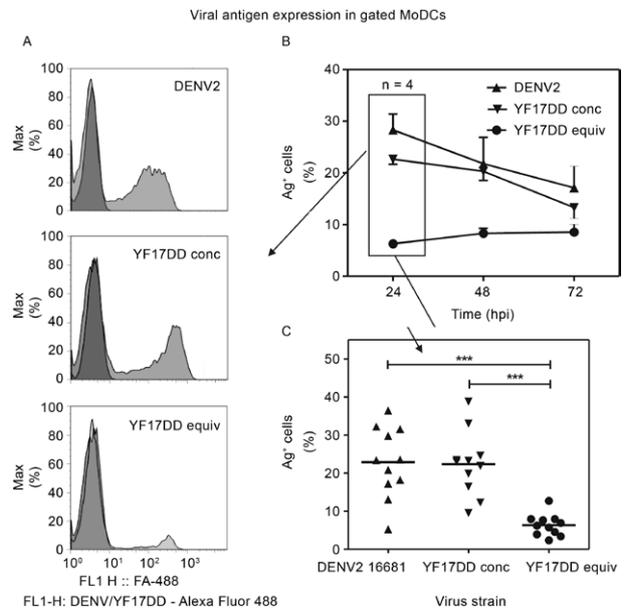


Fig. 2: monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) infection with dengue virus 2 (DENV2) infection and yellow fever (YF) 17DD. MoDCs were infected with DENV2 or YF17DD at equivalent multiplicity of infections (MOIs) [ $2.5 \times 10^5$  50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>/mL) or YF17DD at a higher MOI ( $1.25 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL) or mock-infected. Cells were labelled with anti-DENV or anti-YF monoclonal antibodies using triplicates for each peripheral blood mononuclear cells (PBMC) donor. A: flow cytometry patterns for viral antigens on gated MoDCs 24 h after in vitro infection. Histograms demonstrate cell distribution by Alexa Fluor-488 fluorescence intensity (FL1-H: level of fluorescence). Cells were cultured with mock (dark grey) or DENV2 or YF17DD (light grey) at concentrated (conc) or equivalent (equiv) doses; B: viral antigen detection kinetics on infected MoDCs (data from four PBMC donors) [hpi: hours post-infection; X axis: time after infection (hours); Y axis: percentage of viral antigen positive cells (Ag<sup>+</sup>)]; C: intracellular viral antigen detection 24 h after infection representing 11 cell donors (horizontal lines: distribution mean; X axis: viral inoculum; Y axis: percentage of viral Ag<sup>+</sup> cells. Asterisks mean:  $p < 0.0001$  in one-way analysis of variance and Tukey's multiple comparison test).

**CD38 and OX40L activation/maturation markers are regulated during MoDCs infection with DENV2 and YF17DD** - DCs interact with pathogens or exogenous molecules and undergo activation and maturation processes, resulting in reduced antigen processing capacity and increased expression of co-stimulatory and adhesion molecules. These molecules may induce tissue migration, antigen-specific immunological responses and Th polarisation (Quah & O'Neill 2005, Wallet et al. 2005). CD38 is involved in chemotaxis and calcium mobilisation and binds to CD31 on endothelial cells, facilitating DC migration through endothelium (Frasca et al. 2006). It may participate in the Th-1 response, which involves lymphocytes producing IL-12 and IFN- $\alpha$ . On the other hand, OX40L expression on DCs (Ohshima et al. 1997) may contribute to the Th-2 polarisation by enhancing IL-4 and IL-13 induction and suppressing IFN- $\alpha$  after it binds to OX40 on T cells (Ohshima et al. 1998, Delespesse et al. 1999).

MoDCs were cultured with DENV2, YF17DD or mock supernatants. Fig. 3A shows that CD38 was weakly expressed on infected cells but increased when fluorescence intensity virus was present. DC activation occurs between 48-72 hpi (Fig. 3B). MoDCs express OX40L early in infection, but this molecule was downregulated at 48 and 72 hpi (Fig. 3C). This shift is shown in the histograms from flow cytometry data (Fig. 3A), whereas the mock-infected cells remain unchanged and express OX40L.

The ratio of percentages of CD38 and OX40L-expressing cells was calculated for each PBMC donor. In the presence of DENV2, there was an increase from  $0.49 \pm 0.01$  at 24 hpi to  $1.90 \pm 0.34$  at 48 hpi. A similar pattern was observed for the YF17DD-infected cultures, with a ratio of  $0.50 \pm 0.15$  at 24 hpi and one of  $1.55 \pm 0.03$  at 72 hpi. For mock-infected cells this ratio remained below 0.5 (data from 2 cell donors). We therefore observed a change in the CD38 and OX40L balance during infection by both flaviviruses.

*Several cytokines and chemokines are present in supernatants of virus-infected MoDCs* - Cytokines and chemokines play important roles in dengue physiopathology (Bozza et al. 2008, Noisakran & Perng 2008). Since DCs are one of the main sources for these molecules early in viral infection, we investigated the production of several of them after MoDC infection by DENV2 and YF17DD from 24-120 hpi. We searched for the presence of inflammatory cytokines, chemokines and antiviral molecules that could drive T cell polarisation, either inducing vascular permeability or controlling infection. We detected TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-1Ra, IL-10, MIP-1 $\beta$ /CCL-4, MCP-1/CCL-2, IP-10/CXCL-10 and RANTES/CCL-5 in cell culture supernatants. A mock-infected MoDC culture supernatant was also assayed.

Cytokines were detected after infection by both flaviviruses. IL-6 and IL-10 (Fig. 4A, B) were detected in cultured PBMC from seven donors at significant levels ( $p < 0.5$ , in a Wilcoxon signed rank test). These factors are known to modulate the immune response (Sabatte et al. 2007). IL-1Ra, the antagonist of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  and chemotactic factor IP-10 were also increased in most of the donors tested (Fig. 4C, D), although with borderline significance ( $0.0624 < p < 0.0782$ ; in a Wilcoxon test). RANTES and MCP-1 are both chemokines related to severity of infection (Lee et al. 2006, Pulendran et al. 2008) and were only slightly increased after infection (Fig. 4E, F). However, low donor numbers did not allow us to perform reliable statistical analysis between the two viruses. MIP-1 $\beta$ /CCL-4, which is correlated with non-severe disease, was detected in mock cultures from seven PBMC donors and, apparently, its production was not altered after infection with either virus (data not shown). In vivo, other cells may be responsible for its synthesis and release.

Significant TNF- $\alpha$  amounts were already detected at 24 hpi in the presence of either virus when compared to the mock culture (data not shown), with a peak at 48 hpi and a decline thereafter in most PBMC donors tested (Fig. 5). DENV2 induced the highest TNF- $\alpha$  levels ( $255 \pm 75$  pg/mL), which were significantly higher when

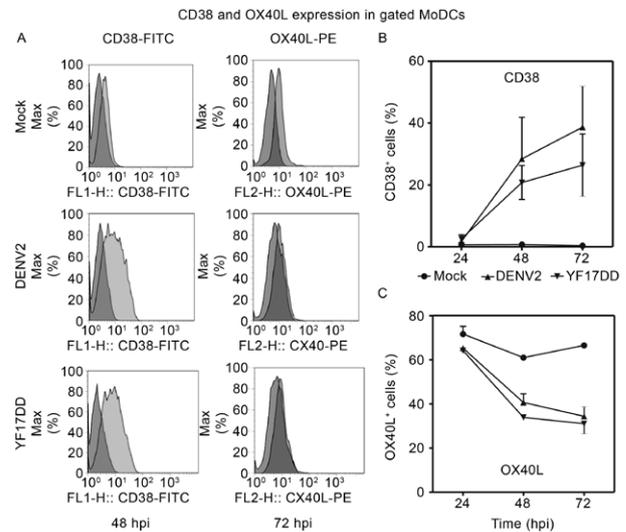


Fig. 3: CD38 and OX40L maturation markers expression during dengue virus 2 (DENV2) and yellow fever (YF) 17DD monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) infection. MoDCs were infected with DENV2 [ $2.5 \times 10^5$  50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>/mL)] or YF17DD ( $1.25 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL) or mock-infected. Cells were labelled with anti-CD38-FITC and anti-OX40L-PE monoclonal antibodies. A: flow cytometry patterns on gated MoDCs for CD38 at 48 h (left panel) and OX40L at 72 h (right panel) after in vitro incubation with mock, DENV2 or YF17DD. Overlapping histograms from labelled cells (light gray for CD38 or OX40L) and isotype control labelling (dark gray). FL1-H: level of fluorescence; hpi: hours post-infection; B: CD38 or OX40L (C) expression on MoDCs incubated with DENV2, YF17DD or mock. Data were calculated by statistically reducing the number of positive cells on isotype control from each sample (histogram by Overton Subtraction Method, Summit, Dako Automation). Assays were performed in triplicates for each of two peripheral blood mononuclear cells donors.

compared with those produced by YF17DD ( $121 \pm 31$  pg/mL) in eight different PBMC donors assayed at 48 hpi ( $p = 0.0156$  in the Wilcoxon test).

In Fig. 6, IFN- $\alpha$  is plotted against viral Ag<sup>+</sup> cells during the course of infection in four different PBMC donors. At 24 hpi, IFN- $\alpha$  is already detected in YF17DD-infected MoDCs and at 48 hpi in DENV2-infected MoDCs. Virus load decreases as the IFN- $\alpha$  levels increase. MoDCs from seven donors were assayed side-by-side at 48 h with both viruses and those infected with YF17DD produced significantly higher IFN- $\alpha$  levels ( $393 \pm 139$  pg/mL) than those infected with DENV2 ( $72 \pm 29$  pg/mL;  $p = 0.0156$  in a Wilcoxon test).

When the ratio of TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$  levels for each cell donor is calculated, significantly higher indexes were obtained for DENV2 ( $13 \pm 6$ ) than for YF17DD ( $1.1 \pm 0.3$ ;  $p = 0.0156$  in a Wilcoxon test).

As mentioned, data shown in Fig. 4B were generated with higher doses of YF17DD than DENV2 inoculum dose to obtain viral Ag<sup>+</sup> cells at the same rates. When YF17DD was inoculated at DENV2 equivalent MOIs (thus resulting in lower infection rates) (Fig. 2), IFN- $\alpha$  levels were 2-10 times higher in YF17DD cultures than those in DENV2. Therefore, the TNF- $\alpha$  vs. IFN- $\alpha$  cytokine imbalance has a different pattern in the two flavivirus studied irrespective of the MOI used.

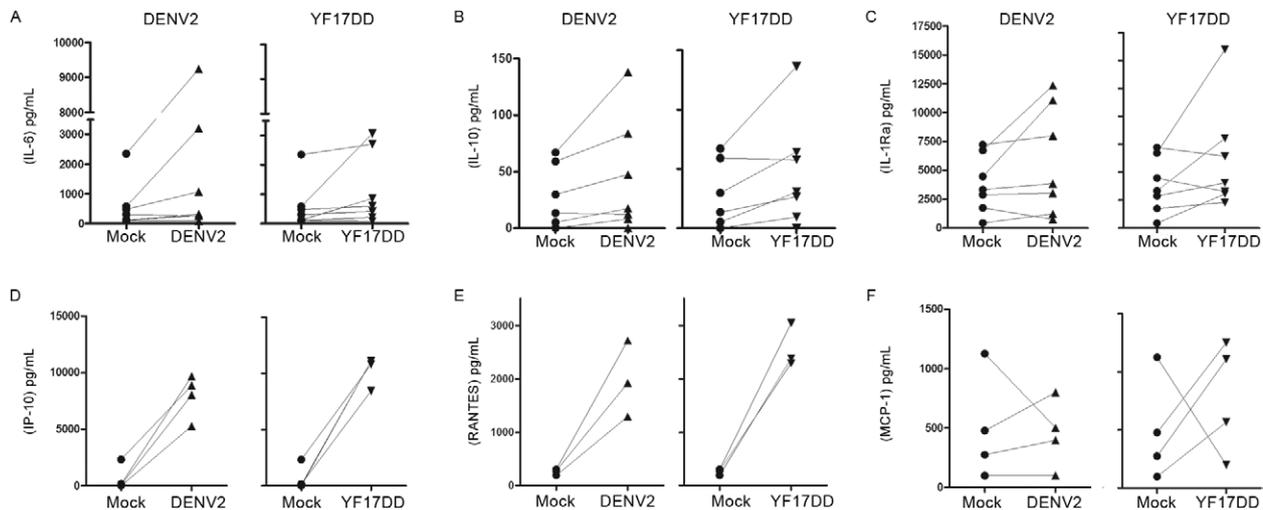


Fig. 4: multiple cytokine and chemokine induction by dengue virus 2 (DENV2) or yellow fever (YF) 17DD after monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) infection. MoDCs were infected with DENV2 [ $2.5 \times 10^5$  50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>/mL)] or mock-infected. Supernatants were collected 48 h after infection and analyzed by immunofluorescent multiplex-bead assay. A-F: lines represent paired production for each donor of interleukin (IL)-6 (A), IL-10 (B), IL-1 receptor agonist (Ra) (C), CXCL-10/IP-10 (D), CCL-5/RANTES (E) and CCL-2/MCP-1 (F) induced after mock virus infection. Three-seven peripheral blood mononuclear cells donors were used.

*YF17D/DENV2 vaccine virus infection compared with DENV2 or YF17DD infections* - To investigate whether a chimeric dengue target vaccine virus could induce similar responses to the YF17DD vaccine virus, we performed pilot experiments infecting MoDCs with the YF17D/DENV2 vaccine virus. Cell infection rates were lower for the chimeric virus compared with the other two viruses (DENV2 16681 strain and YF17DD) (Fig. 1). IFN- $\alpha$  levels detected in experiments with this chimeric virus were slightly higher than those produced by DENV2, but these differences were not statistically significant (Wilcoxon signed rank test). However, TNF- $\alpha$  levels were significantly higher after DENV2 infection when compared with YF17D/DENV2 infection ( $p = 0.0313$ ). Therefore, the chimeric vaccine virus apparently displayed a similar cytokine response profile to YF17DD, even though it had lower replication rates.

## DISCUSSION

During either a natural infection or a vaccination, the entry site of flaviviruses into the vertebrate host is the dermis. Langerhans cells were characterised as permissive cells for DENV *in vivo* replication (Wu et al. 2000). Indeed, DCs have a crucial role in initiating host defence mechanisms; through antigen presentation and cytokine production, they can define the fate of the immunological response (Blanco et al. 2008). Both DENV and YF vaccine viruses are known to infect DCs and monocytes *in vitro* (Wu et al. 2000, Barba-Spaeth et al. 2005, Reis et al. 2007). We aimed to characterise the similarities and differences between flavivirus infections with distinct virulence patterns that elicit long lasting *in vivo* immunity (Monath 2001, Halstead 2007).

DC infections with the YF Brazilian vaccine strain 17DD and with YF17D/DENV2 (44/3) chimeric virus were reported here for the first time. The YF17DD vac-

cine virus infects cells at inoculum doses equivalent to those used for DENV2 (16681 strain) but showed reduced expression of viral antigens within DCs at all time points tested when compared to DENV. Similar results were described for the YF vaccine strain 204, which is poorly infectious compared with DENV (Deauvieux et al. 2007). Other authors used higher MOIs for DENV to obtain the same relative infection level as West Nile virus because these viruses replicate at different rates. They then studied NS1 antigenic expression by flow cytometry analysis (Youn et al. 2010).

DENV sequences from YF17D/DENV2 (44/3) studied here are from the NGC virus. Although our DENV2 originated from strain 16681, NGC and 16681 are very similar with regard to their genome and they belong to the same genotype - SE Asian strains - that characteristically induce the most severe forms of dengue fever (Leitmeyer et al. 1999). We do not intend to compare the virus structures but instead the virulence (pathogenic vs. vaccine).

Virulent YF wild-type or Asibi strains have not been reported to infect DCs, but a few studies compared these viruses with YF17DD during infection in Kupffer or endothelial cells (Khaiboullina et al. 2005, Woodson et al. 2011). Both viruses infect these cells, but the resulting cytokine production is quite different. The virulent YF strains produce a much more intense pro-inflammatory cytokine response (including TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 and RANTES/CCL5) than the YF vaccine, which produces more IL-10.

During infection by viruses, DCs may undergo several phenotypic changes to become activated and capable of antigen presentation to T lymphocytes. Among these changes is the upregulation of surface markers and soluble molecules related to the polarisation of the T effector cell response. YF17DD immunisation leads to natural killer (NK) cell and monocyte activation (Martins et al. 2008). With respect to DENV and YF17D/

DENV chimeric viruses, earlier reports showed that activation molecules, such as CD80, CD86 and CD83, can be upregulated after DC infection (Libraty et al. 2001, Deauvieu et al. 2007, Sun et al. 2009). Co-stimulation molecules, such as CD38, are present in circulating monocytes but are poorly expressed after their differentiation into immature DCs. During the maturation process, CD38 is re-expressed on DCs (Fedele et al. 2004). In the present study, we observed that flavivirus infection favours CD38 expression on DCs. This molecule is involved in cytoplasmic calcium release, chemotaxis and IFN- $\gamma$  production, indicating a role for CD38 in Th-1 polarisation (Frasca et al. 2006).

OX40L expression is a fundamental requirement for optimal induction of primary and memory Th-2 responses in vivo. It binds to OX40 on T lymphocytes and stimulates the appropriate expansion and/or survival of T cells, leading to IL-4 and IL-13 production (Jenkins et al. 2007, Blazquez & Berin 2008). Here we observed that the immature DCs expressed OX40L in culture and that this expression was downregulated as infection progressed in both viral infections. These data are informative with respect to Th-1/Th-2 axis determination by surface markers on DCs after flavivirus infection. CD38 upregulation and OX40L downregulation indicate that both viruses favour a Th-1 type response during the early immune response, which likely plays a role in virus clearance, although a Th-2 response may be present as well during infections by both viruses (Bozza et al. 2008, Querec et al. 2009).

Indeed, Th-1/Th-2 mixed cytokine patterns, in which an early Th-1 profile gives rise to a late Th-2-predominant pattern, likely occur during the course of a dengue fever infection (Chaturvedi et al. 2000, Mustafa et al. 2001, Nguyen et al. 2004). The difference in timing of IFN- $\gamma$  peaks in plasma have influences the severity of disease. On the other hand, reports of an association between low T-bet mRNA expression and high IL-10 levels may indicate a Th-2 role in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (Chen et al. 2005). YF17DD vaccination leads to a mixed pro/anti-inflammatory cytokine profile, including TNF $^+$  monocytes, IFN- $\gamma^+$  NK cells and IL-10 $^+$  cells (Silva et al. 2011).

Infection of DCs by DENV induces T cells to produce IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$ , suggesting a mixed Th cytokine pattern (Ho et al. 2004). DCs infected with YF17DD stimulate CD8 $^+$  T cells from YF17DD-immunised or naive donors and induce IFN- $\gamma$  and present antigen specifically to CD8 $^+$  and CD4 $^+$  T cells (Barba-Spaeth et al. 2005). In the present study, DC cultures infected with flaviviruses were able to produce a panel of several cytokines and chemokines, which were similar in both viral infections. It is likely that chemokines produced by DCs after flavivirus infections, such as IP-10, RANTES and MCP-1, might be signalling to monocytes, NK cells and Th-1 type lymphocytes, resulting in modulation of endothelial permeability, chemotaxis to the site of inflammation, migration to inflammatory sites and T cell polarisation (Aliberti et al. 2000, Thomsen et al. 2003, Nightingale et al. 2008). These cell subsets are crucial for viral clearance and efficient immunological response

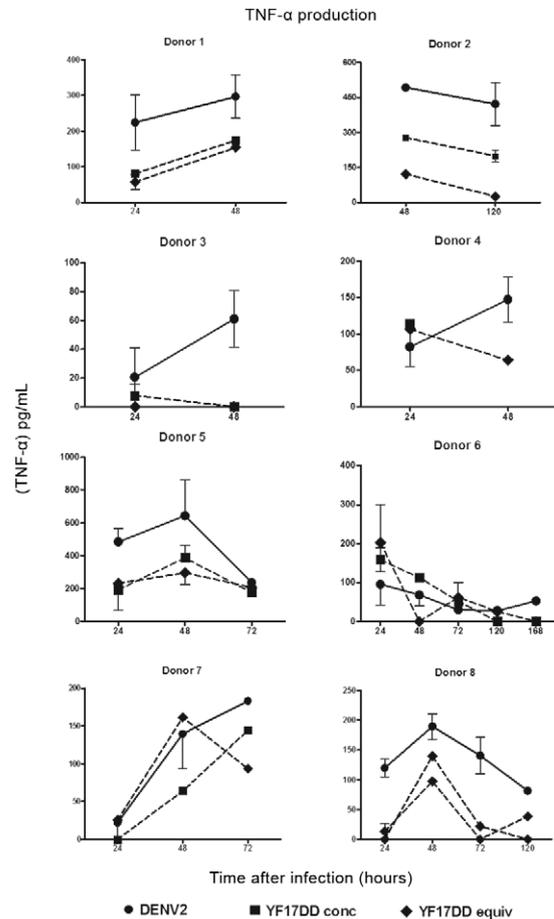


Fig. 5: tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  induction by dengue virus 2 (DENV2) or yellow fever (YF) 17DD after monocyte-derived dendritic cells (MoDCs). MoDCs were infected with DENV2 or YF17DD equivalent (equiv) doses [ $2.5 \times 10^5$  50% tissue culture infectious dose (TCID $_{50}$ /mL)] and YF17DD at concentrated (conc) dose ( $1.25 \times 10^6$  TCID $_{50}$ /mL). Cultures were incubated from 24-168 h. TNF- $\alpha$  cell culture supernatant content was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Individual data for eight different peripheral blood mononuclear cells donors are shown. Mock-infected cells were included for each donor, but no detectable TNF- $\alpha$  was recorded (data not shown). Mean and standard error from on-three replicates were plotted.

generation, but we cannot exclude the possibility that an excessive inflammatory reaction may result in exacerbation of disease severity.

The most striking differences between the DENV2 and YF17DD viruses were found in TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$  production by DCs. TNF- $\alpha$  levels are significantly increased after DENV2 infection in DC cultures, but only slightly altered in the presence of YF17DD and YF17D/DENV2. On the other hand, these viruses were able to elicit high IFN- $\alpha$  levels that not reached during DENV2 infection.

TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine that has often been found in patients with acute dengue fever and high levels are associated with haemorrhagic manifestations (Hober et al. 1993, Kubelka et al. 1995, Braga et al. 2001, Chakravarti & Kumaria 2006). Together with IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  is known to increase acute phase protein production and act in synergy with other factors to in-

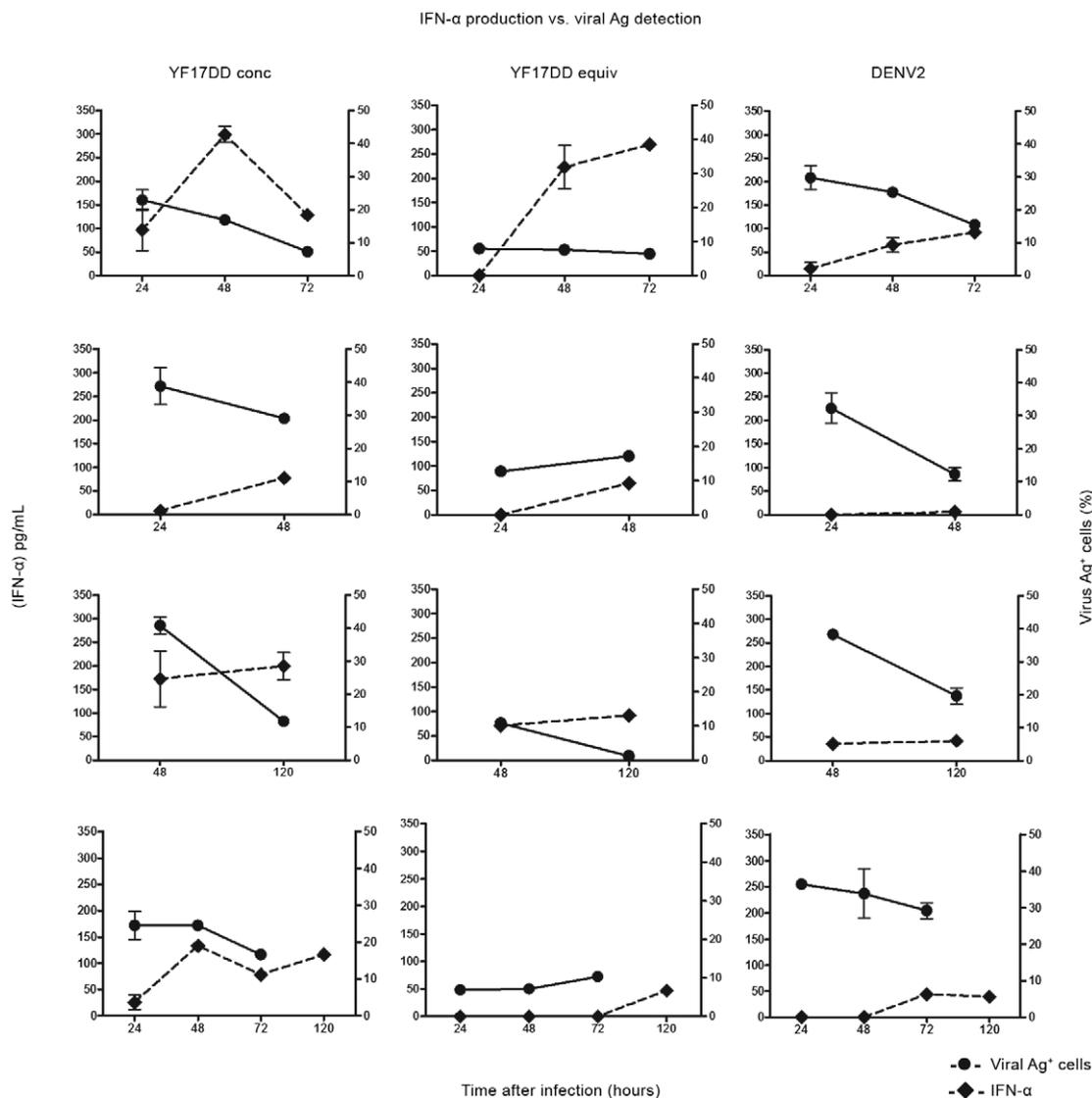


Fig. 6: viral antigen positive cells (Ag<sup>+</sup>) vs. interferon (IFN)- $\alpha$  production by monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) after dengue virus 2 (DENV2) or yellow fever (YF) 17DD infection. MoDCs were infected with DENV2 or YF17DD equivalent (equi) doses [ $2.5 \times 10^5$  50% tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>/mL) or YF17DD at concentrated (conc) dose ( $1.25 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL)]. Cultures were incubated from 24-120 h. X axis represents time after infection. Left Y axis, the percentage of viral Ag<sup>+</sup> cells obtained after flow cytometry analysis. Right Y axis, the IFN- $\alpha$  cell supernatant content determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Individual data for four different peripheral blood mononuclear cells donors are shown. Mock-infected cells were included for each donor, but no detectable IFN- $\alpha$  was recorded (data not shown). Mean and standard error from one-three replicates were plotted.

duce microbicidal activity during phagocytosis (Clark 2007). It also has the capacity to induce the upregulation of endothelial adhesion molecules, which in turn signal to chemotactic peptides and lipid mediators and facilitate leukocyte recruitment, which may result in plasma leakage and hypovolemic shock. In our *in vitro* infection model, we observed markedly higher TNF- $\alpha$  production after infection with pathogenic virus (DENV2) as compared to the non-pathogenic viruses (YF17DD and YF17D/DENV2), providing further evidence that this cytokine plays a role in flavivirus immunopathogenesis. Other authors have also observed TNF- $\alpha$  production in DC or monocyte cultures in the presence of DENV2

and some authors even associate it with the infected cell (Hacker et al. 1998, Querec et al. 2006, Deauvieau et al. 2007, Reis et al. 2007, Ahmad et al. 2008, Nightingale et al. 2008, Levy et al. 2009). A moderate level of TNF- $\alpha$  production may be beneficial to mature cells that may become good antigen presenters. This cytokine was detected in YF vaccinated individuals (Roers et al. 1994, Querec et al. 2006, Deauvieau et al. 2007, Levy et al. 2009, Silva et al. 2011).

IFNs are classically known as antiviral molecules and some reports confirm that flaviviruses are susceptible to these molecules (Roers et al. 1994, Diamond et al. 2000). Indeed, these viruses stimulate IFN- $\alpha$  produc-

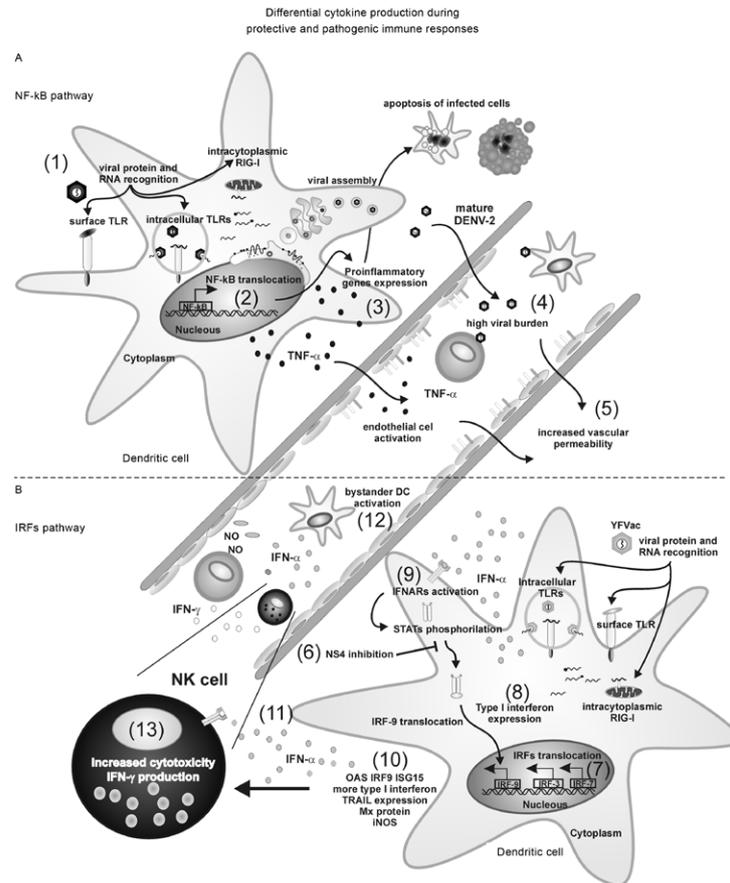


Fig. 7: theoretical model for dendritic cell (DC)-flavivirus interaction. A: during target cell infection, dengue virus (DENV) is sensed/recognized by pattern recognition receptor (1), triggering preferentially pro-inflammatory genes such as for nuclear factor kappa B (NF-κB) (2), resulting in a high tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  production (3), while in B interferon (IFN)- $\alpha$  is partially inhibited by DENV proteins, such as NS4, through signal transducer and activator of transcription-2 expression (STAT) inhibition (4). Back to A, DENV infection outcome consists in a high viral load (5) followed by an enhancement of pro-inflammatory gene activation and induction of plasma leakage (6). In B, yellow fever (YF) vaccine virus induces preferentially the IFN pathway activating IRF-7 and IFN-stimulated response element (ISRE) (7) that further induce a high IFN- $\alpha$  production (8), resulting in paracrine or autocrine IFN-associated receptor (IFNAR)-dependent activation (9). In turn, IFN-stimulated genes are expressed (10) such as oligoadenylate synthetase (OAS), interferon (IFN) regulatory factor (IRF)-9, IFN-stimulated gene (ISG)-15, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), inducible nitric oxide synthase (iNOS), among others, contributing to a low virus load. Besides its antiviral effects on virus replication, a second IFN- $\alpha$  production wave, IFNAR-dependent (11), exert other functions such as: protecting bystander DCs from *de novo* infection (12); activating natural killer cells that are IFN- $\gamma$  producers and efficient cytotoxic killers for infected-targets (13). IFNs can activate monocytes to produce nitric oxide (NO), another antiviral molecule. RIG-I: retinoic-acid-inducible gene I; TLR: Toll-like receptor.

tion (Libraty et al. 2001, Deauvieau et al. 2007, Palmer et al. 2007, Querec et al. 2009), although IFN- $\alpha$  induction was not compared between viruses in previous reports. Earlier studies show that DENV is able to escape IFN action by inhibiting steps of IFN type I activation pathways through a decrease in the signal transducer and activator of transcription-2 expression (STAT-2) (Jones et al. 2005). This effect is mediated by the viral non-structural protein 4. Recently, low levels of IFN- $\alpha/\beta$  production by DENV2-infected MoDCs has been reported as playing a role in the failure of DCs to prime T cells (Rodríguez-Madoz et al. 2010).

In Fig. 7, we outline a theoretical model for flavivirus interactions with DCs. Flavivirus infection may trigger differential signalling pathways that lead to an early clearance of virus. These pathways might include an IFN

pathway that activates IFN-regulatory gene (IRF)-7 and IFN-stimulated response element (ISRE), which in turn further induces high IFN- $\alpha$  and nitric oxide production. Alternatively, the blockage of antiviral pathways, such as STAT activation by non-structural viral proteins, may lead to higher virus load and intense stimulation of inflammatory/pathologic mechanisms such as TNF- $\alpha$ . The IFN- $\alpha$  produced by target cells may act on IFN- $\alpha$  receptors on bystander cells to protect them from further infections. Furthermore, IFN- $\alpha$  activates natural killer cells, which have cytotoxic and antiviral functions and produce IFNs that in turn can activate monocytes to exert antiviral functions through nitric oxide production.

Here we observed that DCs infected with YF17DD and YF17D/DENV2 produce more IFN- $\alpha$  than those infected with DENV2. These data suggest that the vac-

cine viruses may have different virulent properties than DENV2 and that they may have lost (or never acquired) the ability to inhibit the ISRE pathway that was hypothesised to play a role in DENV infection in Fig. 7. YF vaccination in human subjects studied by microarray analysis showed a response profile related to IFN-based antiviral responses (Scherer et al. 2007, Querec et al. 2009), suggesting a role for IFNs in effective protection from this vaccine. On the other hand, functional genetic studies identified several transcripts for IFN-stimulated genes in patients with dengue fever that were less abundant in adults with dengue shock syndrome, reinforcing the attenuating role of IFNs after infection (Simmons et al. 2007). Vaccine or therapeutic approaches may indeed provide the ability to induce antiviral molecules such as IFNs without inducing or modulating factors involved in vascular permeability.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Denise Cerqueira, Lidiane Martins de Albuquerque and Luciana Gomes Fialho, for their technical collaboration, suggestions and encouragement.

#### REFERENCES

- Ahmad SM, Haskell MJ, Raqib R, Stephensen CB 2008. Men with low vitamin A stores respond adequately to primary yellow fever and secondary tetanus toxoid vaccination. *J Nutr* 138: 2276-2283.
- Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, Sher A 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha<sup>+</sup> dendritic cells. *Nat Immunol* 1: 83-87.
- Assuncao-Miranda I, Amaral FA, Bozza FA, Fagundes CT, Sousa LP, Souza DG, Pacheco P, Barbosa-Lima G, Gomes RN, Bozza PT, Da Poian AT, Teixeira MM, Bozza MT 2010. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J* 24: 218-228.
- Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, Nogueira RM, Miagostovich MP, Kubelka CF 2001. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* 204: 494-507.
- Bae HG, Domingo C, Tenorio A, de Ory F, Munoz J, Weber P, Teuwen DE, Niedrig M 2008. Immune response during adverse events after 17D-derived yellow fever vaccination in Europe. *J Infect Dis* 197: 1577-1584.
- Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM 2005. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med* 202: 1179-1184.
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J 2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 41-52.
- Blazquez AB, Berin MC 2008. Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L. *J Immunol* 180: 4441-4450.
- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF 2008. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* 8: 86.
- Braga ELA, Moura P, Pinto LMO, Ignacio SRN, Oliveira MJC, Cord-eiro MT, Kubelka CF 2001. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 229-232.
- Caufour PS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira I, Jabor AV, Bonaldo MC, Freire MS, Galler R 2001. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Res* 79: 1-14.
- Chakravarti A, Kumaria R 2006. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue hemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res* 123: 25-30.
- Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS 2000. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28: 183-188.
- Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shieh SC, Chen SH, Liu HS, Lin YS, Wang ST, Shyu HW, Yeh TM 2006. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 74: 142-147.
- Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Wang L, Chang JC, Yu HR, Cheng JT, Yang 2005. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44: 43-50.
- Clark IA 2007. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 18: 335-343.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80: 11418-11431.
- Deauvieu F, Sanchez V, Balas C, Kennel A, Dem A, Lang J, Guy B 2007. Innate immune responses in human dendritic cells upon infection by chimeric yellow-fever dengue vaccine serotypes 1-4. *Am J Trop Med Hyg* 76: 144-154.
- Delespesse G, Ohshima Y, Yang LP, Demeure C, Sarfati M 1999. OX40-mediated cosignal enhances the maturation of naive human CD4<sup>+</sup> T cells into high IL-4-producing effectors. *Int Arch Allergy Immunol* 118: 384-386.
- Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E 2000. Modulation of dengue virus infection in human cells by alpha, beta and gamma interferons. *J Virol* 74: 4957-4966.
- Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, Mongkolsapaya J, Screaton G 2010. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 16922-16927.
- Fedele G, Frasca L, Palazzo R, Ferrero E, Malavasi F, Ausiello CM 2004. CD38 is expressed on human mature monocyte-derived dendritic cells and is functionally involved in CD83 expression and IL-12 induction. *Eur J Immunol* 34: 1342-1350.
- Fink J, Gu F, Ling L, Tolfvenstam T, Olfat F, Chin KC, Aw P, George J, Kuznetsov VA, Schreiber M, Vasudevan SG, Hibberd ML 2007. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl Trop Dis* 1: e86.
- Frasca L, Fedele G, Deaglio S, Capuano C, Palazzo R, Vaisitti T, Malavasi F, Ausiello CM 2006. CD38 orchestrates migration, survival and Th1 immune response of human mature dendritic cells. *Blood* 107: 2392-2399.
- Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM, Jabor AV, Motta MC, Bonaldo MC, Coutinho ES, Freire MS 2005. Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for Rhesus monkeys. *Braz J Med Biol Res* 38: 1835-1846.
- Geisbert TW, Jahrling PB 2004. Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med* 10: S110-121.
- Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, Rothman AL, Ennis FA 1999. Elevated plasma inter-

- leukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol* 59: 329-334.
- Gubler DJ 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10: 100-103.
- Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath TP, Lang J 2010. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* 28: 632-649.
- Hacker UT, Jelinek T, Erhardt S, Eigler A, Hartmann G, Nothdurft HD, Endres S 1998. *In vivo* synthesis of tumor necrosis factor- $\alpha$  in healthy humans after live yellow fever vaccination. *J Infect Dis* 177: 774-778.
- Halstead SB 2007. Dengue. *Lancet* 370: 1644-1652.
- Ho LJ, Shaio MF, Chang DM, Liao CL, Lai JH 2004. Infection of human dendritic cells by dengue virus activates and primes T cells towards Th0-like phenotype producing both Th1 and Th2 cytokines. *Immunol Invest* 33: 423-437.
- Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, Imbert P, Pecarere JL, Vergez-Pascal R, Wattré P 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.
- Jenkins SJ, Perona-Wright G, Worsley AG, Ishii N, MacDonald AS 2007. Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction *in vivo*. *J Immunol* 179: 3515-3523.
- Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenewald P, Schlaak J, Ball S, Foster GR, Jacobs M 2005. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol* 79: 5414-5420.
- Khaiboullina SF, Rizvanov AA, Holbrook MR, St Jeor S 2005. Yellow fever virus strains Asibi and 17D-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression. *Virology* 342: 167-176.
- Kubelka CF, Borges PA, VonSydow FF, Farid FO, Lampe E 1995. Analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$  serum level in Brazilian patients with dengue-2. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 741-742.
- Lanzavecchia A, Sallusto F 2004. Lead and follow: the dance of the dendritic cell and T cell. *Nat Immunol* 5: 1201-1202.
- Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, Lin YS, Yeh TM, Chen SH, Liu HS 2006. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol* 87: 3623-3630.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I de C, Ramos C, Rico-Hesse R 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73: 4738-4747.
- Levy A, Valero N, Espina LM, Anez G, Arias J, Mosquera J 2009. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104: 16-23.
- Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA 2001. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol* 75: 3501-3508.
- Martins MA, Silva ML, Eloi-Santos SM, Ribeiro JG, Peruhype-Magalhaes V, Marciano AP, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA 2008. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine* 26: 1173-1184.
- Miagostovich MP, Nogueira RM, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG 1993. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35: 149-154.
- Monath TP 2001. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 1: 11-20.
- Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC 2001. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 30: 229-233.
- Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI Nogueira RM, Kubelka CF 2005. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute dengue fever in patients and during *in vitro* infection. *BMC Infect Dis* 5: 64.
- 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.
- Nightingale ZD, Patkar C, Rothman AL 2008. Viral replication and paracrine effects result in distinct, functional responses of dendritic cells following infection with dengue 2 virus. *J Leuk Biol* 84: 1028-1038.
- Noisakran S, Perng GC 2008. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 401-408.
- Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahashi Y, Maliszewski C, Delespesse G 1997. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159: 3838-3848.
- Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, Hermann P, Delespesse G 1998. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naïve human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood* 92: 3338-3345.
- Palmer DR, Fernandez S, Bisbing J, Peachman KK, Rao M, Barvir D, Gunther V, Burgess T, Kohno Y, Padmanabhan R, Sun W 2007. Restricted replication and lysosomal trafficking of yellow fever 17D vaccine virus in human dendritic cells. *J Gen Virol* 88: 148-156.
- Post PR, Santos CND, Carvalho R, Lopes OS, Galler R 1991. Molecular analysis of yellow fever virus 17DD vaccine strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 239-246.
- Pulendran B, Miller J, Querec TD, Akondy R, Moseley N, Laur O, Glidewell J, Monson N, Zhu T, Zhu H, Staprans S, Lee D, Brinton MA, Perelygin AA, Vellozzi C, Brachman P Jr, Lalor S, Teuwen D, Eidex RB, Cetron M, Priddy F, del Rio C, Altman J, Ahmed R 2008. Case of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *J Infect Dis* 198: 500-507.
- Quah BJ, O'Neill HC 2005. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J Cell Mol Med* 9: 643-654.
- Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, Akira S, Ahmed R, Pulendran B 2006. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8 and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med* 203: 413-424.
- Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, Pirani A, Gernert K, Deng J, Marzolf B, Kennedy K, Wu H, Bennouna S, Oluoch H, Miller J, Vencio RZ, Mulligan M, Aderem A, Ahmed R, Pulendran B 2009. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 10: 116-125.
- Reis SRNI, Sampaio ALF, Henriques MGM, Gandini M, Azeredo EL, Kubelka CF 2007. An *in vitro* model for dengue virus infec-

- tion that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 983-990.
- Rodriguez-Madoz JR, Bernal-Rubio D, Kaminski D, Boyd K, Fernandez-Sesma A 2010. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. *J Virol* 84: 4845-4850.
- Roers A, Hochkeppel HK, Horisberger MA, Hovanessian A, Haller O 1994. *MxA* gene expression after live virus vaccination: a sensitive marker for endogenous type I interferon. *J Infect Dis* 169: 807-813.
- Sabatte J, Maggini J, Nahmod K, Amaral MM, Martinez D, Salamone G, Ceballos A, Giordano M, Vermeulen M, Geffner J 2007. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 18: 5-17.
- Scherer CA, Magness CL, Steiger KV, Poitinger ND, Caputo CM, Miner DG, Winokur PL, Klinzman D, McKee J, Pilar C, Ward PA, Gillham MH, Haulman NJ, Stapleton JT, Iadonato SP 2007. Distinct gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients infected with vaccinia virus, yellow fever 17D virus or upper respiratory infections. *Vaccine* 25: 6458-6473.
- Schnittler HJ, Feldmann H 2003. Viral hemorrhagic fever - a vascular disease? *Thromb Haemost* 89: 967-972.
- Silva ML, Espirito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhaes V, Caminha RC, de Andrade Maranhao-Filho P, Auxiliadora-Martins M, de Menezes Martins R, Galler R, da Silva Freire M, Marcovistz R, Homma A, Teuwen DE, Eloi-Santos SM, Andrade MC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA 2010. Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 17: 118-126.
- Silva ML, Martins MA, Espirito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JG, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Eloi-Santos SM, Martins-Filho OA 2011. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine* 29: 583-592.
- Simmons CP, Popper S, Dolocek C, Chau TN, Griffiths M, Dung NT, Long TH, Hoang DM, Chau NV, Thao le TT, Hien TT, Relman DA, Farrar J 2007. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 195: 1097-1107.
- Srikiatkachorn A 2009. Plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Thromb Haemost* 102: 1042-1049.
- Srikiatkachorn A, Green S 2010. Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol* 338: 67-82.
- Steinman RM, Nussenzweig MC 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 351-358.
- Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, Ten CH, van der Meer JW 2002. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost* 87: 42-46.
- Sun P, Fernandez S, Marovich MA, Palmer DR, Celluzzi CM, Boonak K, Liang Z, Subramanian H, Porter KR, Sun W, Burgess TH 2009. Functional characterization of *ex vivo* blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. *Virology* 383: 207.
- Thomsen AR, Nansen A, Madsen AN, Bartholdy C, Christensen JP 2003. Regulation of T cell migration during viral infection: role of adhesion molecules and chemokines. *Immunology Lett* 85: 119-127.
- Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VL, Monath TP, Rodrigues SG, Laval C, Costa ZG, Vilela MF, Santos CL, Papaioordanou PM, Alves VA, Andrade LD, Sato HK, Rosa ES, Froguas GB, Lacava E, Almeida LM, Cruz AC, Rocco IM, Santos RT, Oliva OF 2001. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *Lancet* 358: 91-97.
- Wallet MA, Sen P, Tisch R 2005. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res* 3: 166-175.
- Woodson SE, Freiberg AN, Holbrook MR 2011. Differential cytokine responses from primary human Kupffer cells following infection with wild-type or vaccine strain yellow fever virus. *Virology* 412: 188-195.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Bix DL, Hayes CG, Frankel SS 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med* 6: 816-820.
- Youn S, Cho H, Fremont DH, Diamond MS 2010. A short N-terminal peptide motif on flavivirus nonstructural protein NS1 modulates cellular targeting and immune recognition. *J Virol* 84: 9516-9532.



## Research paper

# TRAIL protein localization in human primary T cells by 3D microscopy using 3D interactive surface plot: A new method to visualize plasma membrane

Christophe Gras <sup>a</sup>, Nikaïa Smith <sup>b</sup>, Lucie Sengmanivong <sup>c</sup>, Mariana Gandini <sup>d</sup>,  
 Claire Fernandes Kubelka <sup>d</sup>, Jean-Philippe Herbeuval <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS UMR 8147, Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>b</sup> CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>c</sup> Cell and Tissue Imaging Core Facility (PICT-IBISA) and Nikon Imaging Centre@Institut Curie-CNRS, UMR144, Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France

<sup>d</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunologia Viral, Rio de Janeiro, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 10 February 2012

Received in revised form 7 September 2012

Accepted 12 October 2012

Available online 22 October 2012

## Keywords:

TRAIL  
 CD4<sup>+</sup> T cell  
 3D microscopy  
 ImageJ

## ABSTRACT

The apoptotic ligand TNF-related apoptosis ligand (TRAIL) is expressed on the membrane of immune cells during HIV infection. The intracellular stockade of TRAIL in human primary CD4<sup>+</sup> T cells is not known.

Here we investigated whether primary CD4<sup>+</sup> T cells expressed TRAIL in their intracellular compartment and whether TRAIL is relocalized on the plasma membrane under HIV activation. We found that TRAIL protein was stocked in intracellular compartment in non activated CD4<sup>+</sup> T cells and that the total level of TRAIL protein was not increased under HIV-1 stimulation. However, TRAIL was massively relocalized on plasma membrane when cells were cultured with HIV. Using three dimensional (3D) microscopy we localized TRAIL protein in human T cells and developed a new method to visualize plasma membrane without the need of a membrane marker. This method used the 3D interactive surface plot and bright light acquired images.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The TNF-related apoptosis ligand (TRAIL, Apo2L, TNFSF10, CD253), a TNF- $\alpha$  family member (Wiley et al., 1995), is an apoptotic ligand that induces cell death by binding to its two death receptors DR4 (TRAIL-R1, TNFRSF10A) and DR5 (TRAIL-R2, Apo2, TNFRSF10B, Trick2, TRANCE-R, CD262) (Sheridan et al., 1997; Wu et al., 1997). The two biologically active forms of TRAIL, membrane-bound (mTRAIL) and soluble TRAIL (sTRAIL), are regulated by type I interferon (Sato et al., 2001; Ehrlich et al.,

2003; Tecchio et al., 2004). mTRAIL is expressed by leukocytes, including T lymphocytes (Kayagaki et al., 1999), natural killer cells (Smyth et al., 2001), dendritic cells (Vidalain et al., 2000), B cells, monocytes (Ehrlich et al., 2003) and macrophages (Herbeuval et al., 2003). TRAIL had been extensively studied in oncology (Ashkenazi and Herbst, 2008), due to its property to induce apoptosis of a wide range of tumor cells (Griffith and Lynch, 1998). However, TRAIL localization into immune cells remained poorly documented. We recently demonstrated that plasmacytoid dendritic cells intracellularly stocked TRAIL. Under HTLV-1 stimulation, intracellular TRAIL is rapidly relocalized on plasma membrane transforming pDC into killer cells (IKpDC) (Colisson et al., 2010).

TRAIL may also play a role during HIV-1 infection and progression to AIDS. Indeed, HIV-1 infected patients exhibit higher serum levels of soluble TRAIL than non-infected healthy controls, and TRAIL levels correlate with HIV-1 viral load (Herbeuval et al., 2005a). TRAIL is one of

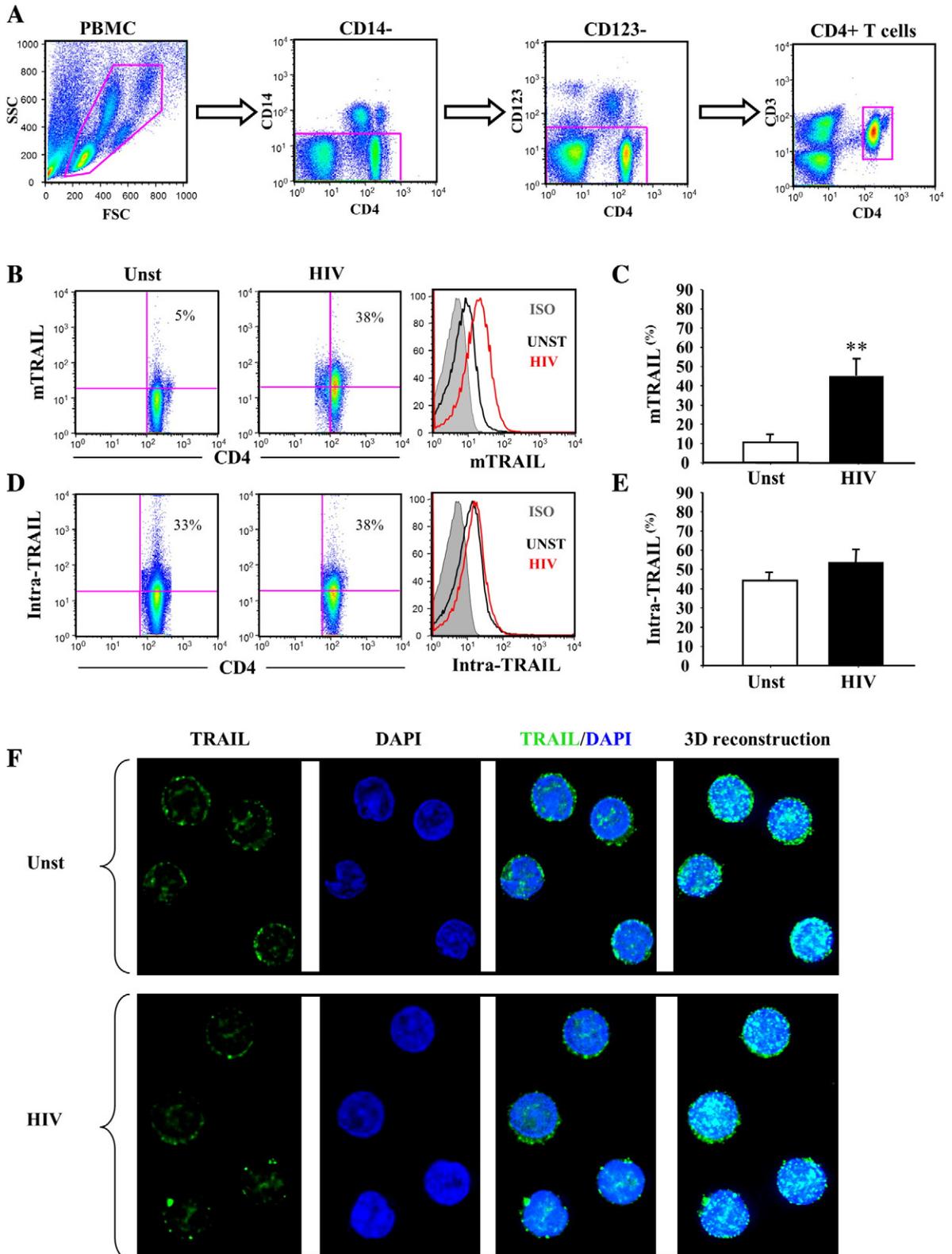
*Abbreviations:* 3D, three-dimensional; pDC, plasmacytoid dendritic cell; CD4<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; DR5, death receptor 5.

\* Corresponding author at: UMR CNRS 8147, Université Paris Descartes, Hôpital Necker, 149-161 rue de Sèvres, 75743 Paris, CEDEX 15, France. Tel.: +33 144 49 53 87; fax: +33 144 49 06 76.

E-mail address: [jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr](mailto:jean-philippe.herbeuval@parisdescartes.fr) (J.-P. Herbeuval).

the first cytokines secreted during the acute phase of HIV infection (Gasper-Smith et al., 2008). TRAIL is expressed in lymphoid tissues of both HIV-1 infected individuals

(Herbeuval et al., 2006) and SIV-infected macaques (Herbeuval et al., 2009). TRAIL selectively induces apoptosis of human HIV-1-exposed CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro* (Lichtner



et al., 2004) and participates *in vivo* in CD4<sup>+</sup> T cell depletion observed in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice (Miura et al., 2001). TRAIL-expressing killer pDC were demonstrated to be in close proximity to apoptotic CD4<sup>+</sup> T cells in tonsils from HIV-infected viremic patients (Stary et al., 2009).

Moreover, a recent study showed that the loss of memory B cells during chronic HIV-1 infection is driven by Foxo3a and TRAIL-mediated apoptosis (van Grevenynghe et al., 2011). We also reported that HIV-1 infection upregulates DR5 expression *in vivo* on primary CD4<sup>+</sup> T cells from infected patients, which were prone to TRAIL-mediated apoptosis (Herbeuval et al., 2005b). Although many studies demonstrated that HIV-1 induced membrane TRAIL expression on human CD4<sup>+</sup> T cells, TRAIL localization in human primary CD4<sup>+</sup> T cells remains unknown. Human primary T cells are characterized by a very large nucleus and a small cytoplasm. Thus, these characteristics make difficult the microscopy study of intracellular protein and membrane localization.

Here we investigated whether TRAIL is intracellularly stocked in human primary CD4<sup>+</sup> T cells and whether HIV-1 stimulation induces a membrane relocation or not. Using three-dimensional (3D) microscopy we localized TRAIL in human T cells and developed a new method to visualize plasma membrane without the need of membrane marker. This method allowed us to precisely determine TRAIL membrane or intracellular localization of TRAIL protein in human primary CD4<sup>+</sup> T cells. The interest of the 3D microscopy is to visualize the entire cell, thus to observe each layer. We can then choose the best stack, meaning the one that represents what we want to show. We stain each protein of interest by a different color. When two proteins are close from each other the colors blend together, creating a new color. We can then deduce what we have a colocalization. We analyze the images with the ImageJ software, using the 3D interactive surface plot and 3D viewer. The interest of the 3D interactive surface plot is to allow us to visualize the membrane without the need of membrane markers. The 3D interactive surface plot is a plugin that creates interactive surface plots from all image types. The luminance of an image is interpreted as height for the plot. Internally the image is scaled to a square image using nearest neighbor sampling. We obtain different heights indicating the intensity of the color, thus the quantity of the stained protein. With the 3D interactive surface plot we observe one stack of the cell, which is a 2D picture image from a 3D acquisition. However it is also a 3D representation of the quantity of protein in the cell.

## 2. Material and methods

### 2.1. Blood samples

Blood from healthy HIV-1-seronegative blood bank donors was obtained from “Etablissement Français du Sang” (convention # 07/CABANEL/106), Paris, France. Experimental procedures with human blood have been approved by Necker Hospital Ethical Committees for human research and were done according to the European Union guidelines and the Declaration of Helsinki.

### 2.2. Isolation and culture of blood leukocytes

*In vitro* experiments were performed using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated by density centrifugation from peripheral blood leukocyte separation medium (Cambrex, Gaithersburg, MD). CD4<sup>+</sup> T cells were purified using the CD4 purification kit (Stem Cell, Grenoble, France). Cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT) and 1% Pen–Strep–Glut (Invitrogen).

### 2.3. Viral stimulation

PBMC or purified CD4<sup>+</sup> T cells were seeded at 10<sup>6</sup> cells per 1 mL and cultured overnight with HIV-1 (MN strand and AT2) at 60 ng/mL p24<sup>CA</sup> equivalent in RPMI 1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT) and 1% Pen–Strep–Glut (Invitrogen). Cells were used for FACS and microscopic experiments.

### 2.4. Flow cytometry

Cultured cells were incubated for 20 min at 4 °C with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD123 (BD Biosciences, San Jose, CA), phycoerythrin (PE)-conjugated TRAIL (eBioscience, San Diego, CA), allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7)-conjugated anti-CD14 (BD Biosciences), Vioblue-conjugated anti-CD4 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), V500-conjugated anti CD3 or with appropriate isotype-matched control antibodies (at 5 mg/mL each) in PBS (Sigma, Saint Louis, MO) and Fc-receptor blockers (BD, Biosciences). Cells were washed twice in ice-cold PBS and FACS analysis was performed on a FACSCanto II 7 colors flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences). Gated cells were then tested for the expression of surface markers using PE-labeled anti-TRAIL (eBioscience). FlowJo software

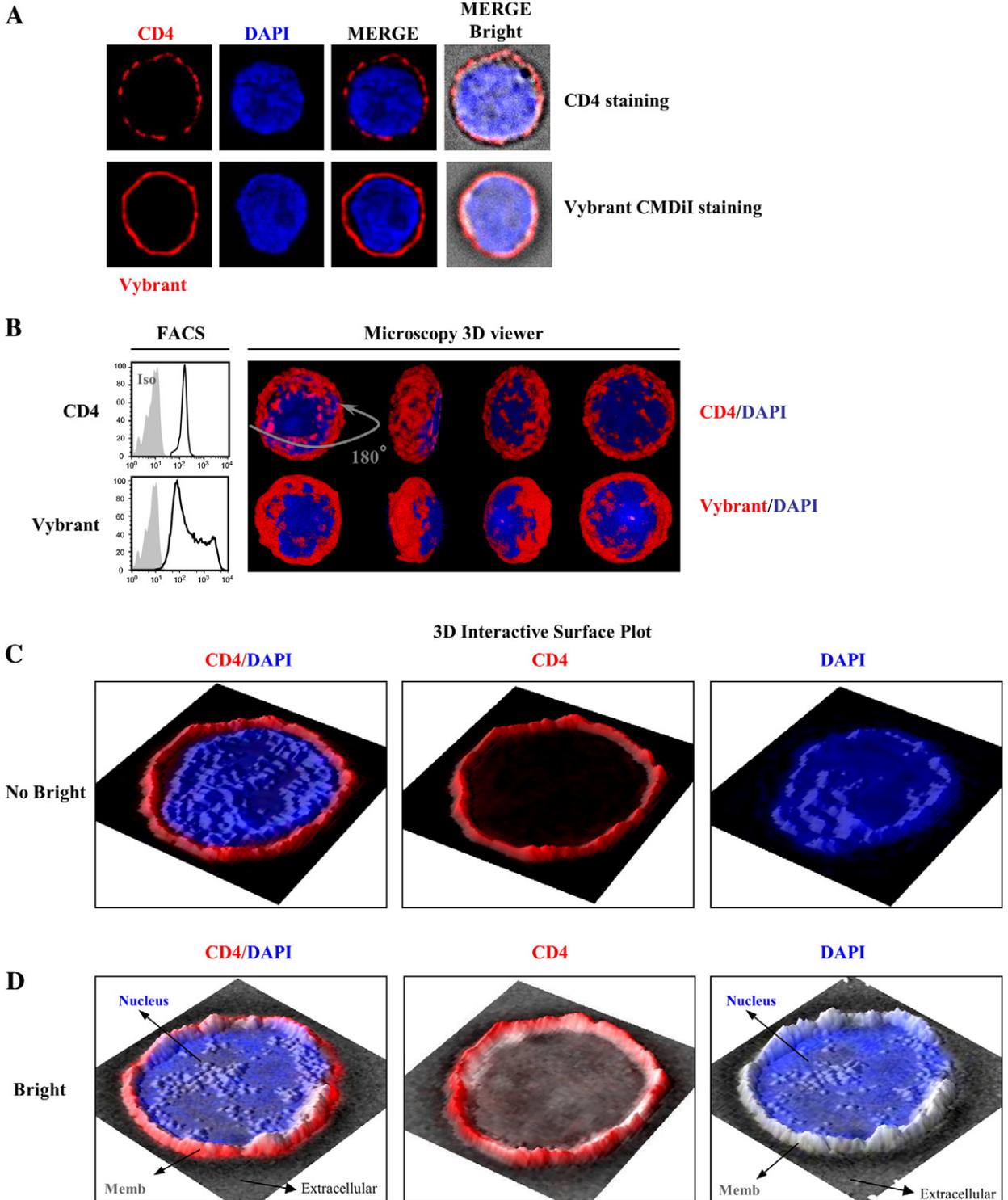
**Fig. 1.** Characterization of CD4<sup>+</sup> T cells in PBMCs and TRAIL expression. A: flow cytometry gating of CD4<sup>+</sup> T cells in PBMC. Live CD4<sup>+</sup> T cell population was gated using FCS/SSC, CD4<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD123<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>. B: PBMC were cultured overnight in the absence or presence of HIV-1. Membrane TRAIL expression by unstimulated (Unst) or HIV-stimulated (HIV) CD4<sup>+</sup> T cells was quantified by flow cytometry. Results show the percentage of membrane TRAIL (mTRAIL) expression by CD4<sup>+</sup> T cells compared to isotype (ISO). C: statistical analysis of membrane TRAIL expression by unstimulated or HIV-1 activated CD4<sup>+</sup> T cells. D: total TRAIL expression by unstimulated (Unst) or HIV-1 stimulated (HIV) CD4<sup>+</sup> T cells using intracellular staining. Results represent the level of intracellular and membrane TRAIL expressed by cells. E: statistical analysis of membrane TRAIL expression by unstimulated or HIV-1 activated CD4<sup>+</sup> T cells. P values (p) were determined using a two-tailed Student's *t* test. *p*<0.05 was considered statistically significant. *p*<0.05 one star, *p*<0.01 two stars, *p*<0.001 three stars. F: study of TRAIL expression by three dimensional (3D) microscopy. Purified CD4<sup>+</sup> T cells were cultured overnight in the absence or presence of HIV-1. The first panel shows TRAIL staining (green), the second panel shows DAPI (blue), third panel shows merged images of TRAIL and DAPI. The fourth panel shows a merged compilation from each stack representing a view of total TRAIL staining by each cell.

(Treestar, Ashland, OR) was used to analyze flow cytometry data.

2.5. Three dimensional microscopy

Purified CD4<sup>+</sup> T cells were cultured overnight in absence or presence of HIV-1. CD4<sup>+</sup> T cells were plated on poly-L-lysine

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)-coated slides and then fixed in 4% paraformaldehyde, quenched with 0.1 M glycine. Cells were incubated in permeabilizing buffer containing 1% saponin with monoclonal antibody anti-TRAIL (ebioscience) and with Alexa647 labeled anti-CD4 (BD Bioscience) or Vybrant CM-Dil (Invitrogen). TRAIL was revealed by a Donkey anti-mouse IgG-Alexa488 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA).



Nucleus was stained using DAPI (Molecular Probes, Paisley, UK). Mounted slides were scanned with a Nikon Eclipse 90i Upright microscope (Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, The Netherlands) using a 100× Plan Apo VC piezo objective (NA 1.4) and Chroma bloc filters (ET-DAPI, ET-GFP) and were subsequently deconvoluted (Sibarita, 2005) with a Meinel algorithm and 8 iterations and analyzed using Metamorph® (MDS Analytical Technologies, Winnersh, UK). TRAIL/CD4/DAPI/Overlay/Confocal plane: representative 2D focal plan. Overlay with bright: bright. Reconvolution overlays: 2D projections of the maximum intensity pixels along the Z axis. 3D: interactive surface plot, 3D reconstruction and 3D viewer analyses of purified CD4<sup>+</sup> T cells were performed using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

### 3. Results

#### 3.1. TRAIL expression by primary CD4<sup>+</sup> T cells

PBMC were isolated from healthy blood donors. CD4<sup>+</sup> T cells were characterized using a battery of immune cell markers (Fig. 1A). First, anti-CD14 antibodies were used to discriminate CD4<sup>+</sup> T cells between monocytes expressing CD4. Anti-CD123 antibodies were used to visualize APC that could potentially express CD4. Finally, anti-CD3 (T cell marker) and anti CD4 antibodies precisely identified CD4<sup>+</sup> T cells (CD14<sup>-</sup> CD123<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>).

CD4<sup>+</sup> T cells were purified from PBMC and cultured with HIV-1 (MN). We tested HIV-1-mediated TRAIL expression on the cell surface of CD4<sup>+</sup> T cells. Membrane TRAIL (mTRAIL) was expressed by 15% of freshly purified CD4<sup>+</sup> T cells from HD when cultured in media overnight without any stimulation (Unst) (Fig. 1B). Thus, *in vitro* exposure to HIV-1 significantly increased the level of membrane TRAIL expression by CD4<sup>+</sup> T cells. The number of CD4<sup>+</sup> T cells expressing mTRAIL (Fig. 1B) was increased by HIV-1 (Fig. 1C) ( $p = 0.0010$ ).

Intracellular staining of TRAIL revealed that unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells expressed high levels of intracellular TRAIL (Fig. 1D). It should be noticed that when doing intracellular stainings, both intracellular and extracellular TRAIL are stained. Surprisingly, HIV did not significantly upregulate intracellular TRAIL (Fig. 1E). These results suggest that the increase of mTRAIL at cell surface by HIV is not due to a global increase of TRAIL protein but rather to a relocalization of TRAIL from intracellular compartment to plasma membrane. Here, we observe 33% of total TRAIL protein in unstimulated cells versus 38% in HIV stimulated cells. There is only a 5% difference in the quantity of TRAIL in and on the cells, which correspond to an increase of 15% of production of TRAIL with HIV.

To test whether TRAIL is relocalized from the intracellular compartment to plasma membrane in HIV-activated CD4<sup>+</sup> T cells, we performed 3D microscopy experiments. Purified CD4<sup>+</sup> T cells were cultured in media alone (unstimulated) or with HIV-1. Permeabilized CD4<sup>+</sup> T cells were stained with TRAIL-Alexa 488 (green) and nuclear staining DAPI (blue). Focal plane analysis revealed the presence of intracellular TRAIL expression in unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells, confirming our cytometry data (Fig. 1F, upper panels). Images also revealed some 'peripheral' TRAIL expression that did not seem to be localized in the cytoplasm but rather on the membrane (Fig. 1F, lower panels). TRAIL expression profile in HIV-1-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells did not seem to differ from unstimulated cells, even if TRAIL appeared to be decreased in the cytoplasm at the expense of "peripheral" TRAIL (Fig. 1F, lower panels). However, it remained hard to distinguish intracellular between membrane profile TRAIL expression in both conditions without the use of a membrane marker. Indeed, even if TRAIL expression profile is lightly different in unstimulated versus HIV-activated CD4<sup>+</sup> T cells, this method of representation is not sufficient to precisely localize TRAIL. Finally, we also used the 3D reconstruction analysis (construction of a 3D model of an object from several two-dimensional views of it) to characterize TRAIL localization in unstimulated and HIV-activated CD4<sup>+</sup> T cells. The different 2D views are compiled to create a 3D reconstruction. This representation allowed the visualization of the total staining of the different plans for each cell. TRAIL expression profiles were quite similar in unstimulated and HIV-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells. Thus this 3D reconstruction analysis was not providing any further information on TRAIL localization.

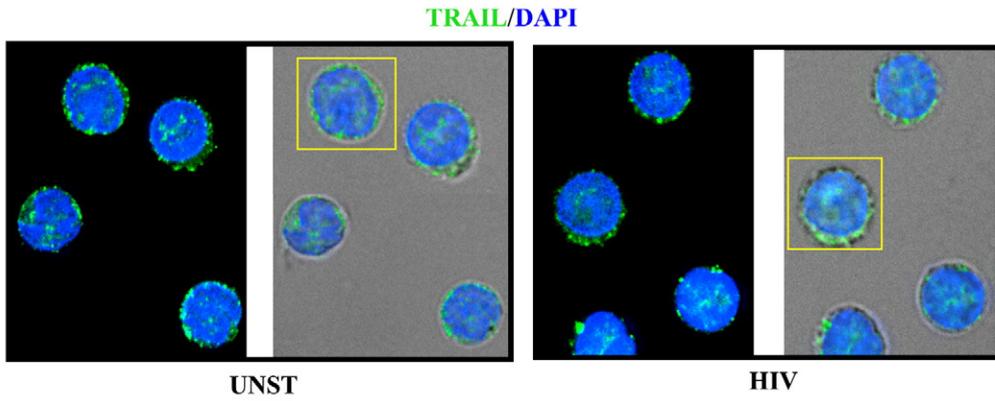
#### 3.2. Membrane visualization using markers and 3D interactive surface plot from ImageJ

To better characterize localization of proteins in CD4<sup>+</sup> T cells, we performed 3D experiments using membrane markers of CD4<sup>+</sup> T cells. Plasma membrane was visualized using anti-CD4 antibodies and the membrane marker Vybrant, and the nucleus was stained with DAPI. Image plane analysis showed that CD4 and/or Vybrant (red) was homogeneously expressed and precisely delineated T cell membrane (Fig. 2A). Overlay pictures also showed the very thin space between the nucleus (DAPI) and the membrane. Right panels showed CD4 and Vybrant using bright light.

Thus to better visualize membrane marker repartition, we showed CD4 expression on T cells using the ImageJ 3D viewer that allowed us to visualize cell surface in 3 dimensions (Fig. 2B). This 3D volume viewer plugin shows stacks as volume visualizations within a 3D XYZ-space. Stacks of the cells are taken from the top of the cell to the bottom. Those

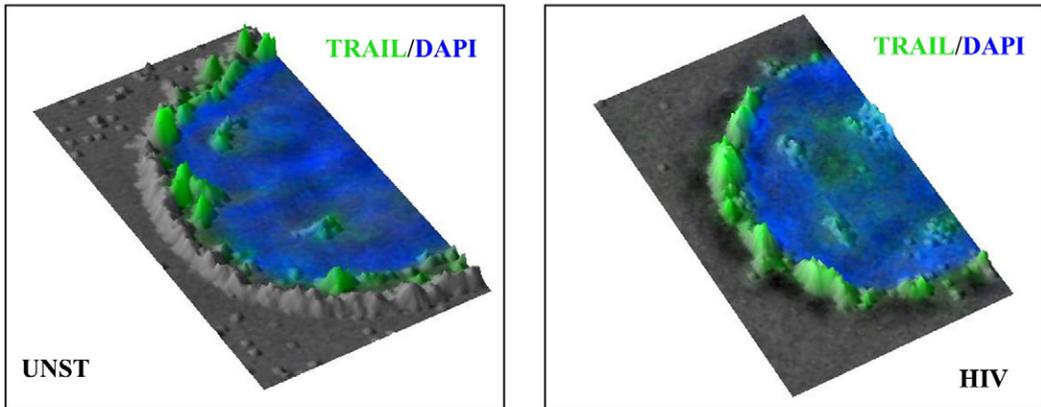
**Fig. 2.** Visualization of plasma membrane using specific staining and interactive surface plot analysis. A: membrane visualization of purified CD4<sup>+</sup> T cells by 3D microscopy: first upper panel shows CD4 staining (red), second upper panel shows DAPI (blue), third panel shows merged images of CD4 and DAPI, and fourth panel shows a merge of third panel acquired using bright light (Bright). First lower panel shows Vybrant membrane marker staining (red, Vybrant), second panel is DAPI (blue), third panel shows merged images of Vybrant and DAPI, and fourth panel shows a merge of third panel acquired using bright light (Bright). B: 3D viewer analysis of CD4<sup>+</sup> T cells stained with CD4 or Vybrant: left plots show CD4 or Vybrant expression analyzed by flow cytometry. Right panels show different angles of CD4 (red) or Vybrant stainings (red) on CD4<sup>+</sup> T cells analyzed using 3D volume viewer. CD4 and Vybrant marker covers the cell surface of T cells. C: interactive 3D surface plot analysis of CD4<sup>+</sup> T cell staining (Vybrant, red) acquired without bright light. Left panel shows CD4 and DAPI staining, middle panel shows membrane marker Vybrant staining alone and right panel shows nucleus DAPI staining alone. D: interactive 3D surface plot analysis of CD4<sup>+</sup> T cell staining (Vybrant, red) acquired bright light. Cells were stained as previously with DAPI and Vybrant. Middle panel allows visualization of plasma membrane (red) that corresponds to grey color on the right panel. Thus bright light acquisition allows a clear visualization of plasma membrane (grey). Data showed are representative of 4 independent experiments.

**A**

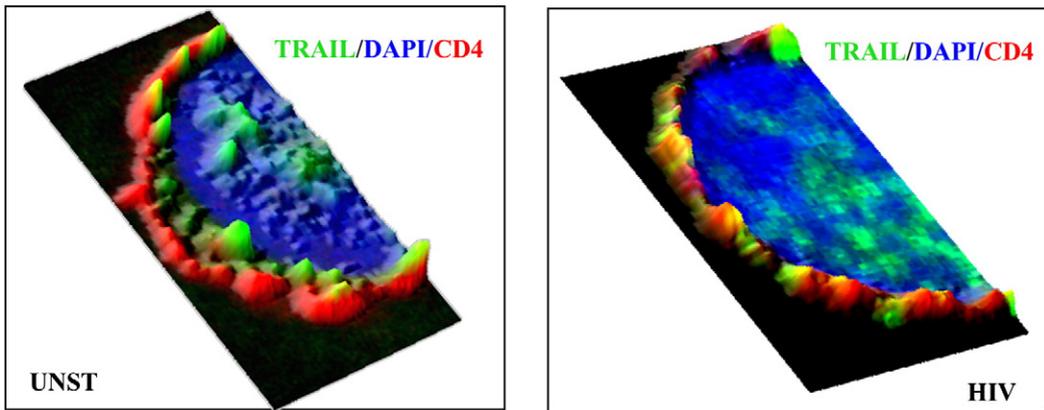


**B**

**3D Interactive Surface Plot**

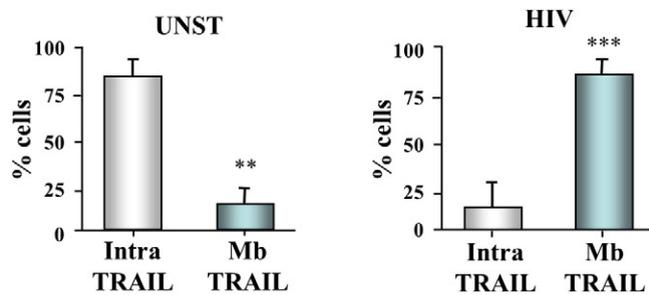


**C**



**D**

**Quantification**



stacks are then put together to get a 3D image. We found that CD4 and Vybrant marker covered the cell surface of T cells.

Thus we used the 3D interactive surface plot plugin of ImageJ software to analyze previous microscopy data. This plugin creates interactive surface plots from all kinds of 3D microscopy pictures. The luminance of each pixel in the image is interpreted as the height for the plot. An adjustment of the lightning condition improves the visibility of small differences. We developed here a new way to visualize the plasma membrane without the need of a marker.

Fig. 2C showed 3D surface plot of T cell where we can clearly see the plasma membrane stained with Vybrant (red) and the nucleus (blue). When Vybrant is removed (right panels) we still could distinguish the nucleus but not the membrane or the cytoplasm. Thus, we acquired the 3D samples with the bright light (Fig. 2D). We could observe the membrane in red, and the nucleus in blue, as observed in Fig. 2C. However, when the plasma membrane marker was removed, we still could observe the membrane, which appeared in light gray. This unique property is due to the different luminance between the plasma membrane (majority of lipids) and the cytoplasm. The interactive 3D surface plot analysis is based on the luminance of each pixel in the image, which is interpreted as the height for the plot. Thus, using bright light acquisition and 3D surface plot analysis, we could clearly visualize plasma membrane without the need of a membrane marker.

### 3.3. TRAIL localization in CD4<sup>+</sup> T cells using 3D surface plot

We next tested whether our method would permit to precisely localize TRAIL by unstimulated and HIV-activated CD4<sup>+</sup> T cells without any plasma membrane marker. Acquisitions from Fig. 1D were performed using bright light (Fig. 3A). Cells were stained with anti-TRAIL antibodies (green) and DAPI. One cell from each condition was selected (Fig. 3B) and interactive 3D surface plot was performed on the bright light acquisition. As shown in Fig. 3C, we could clearly visualize the plasma membrane that appeared in grey, confirming our findings in Fig. 2D. Furthermore, we thus observed that the majority of TRAIL protein was localized in the intracellular compartment. In contrast, when T cells were cultured overnight with HIV-1, 3D interactive surface plot analysis revealed that the vast majority of TRAIL protein was localized on the membrane, which thus appeared in green. These results were in accordance with the cytometry experiments that clearly showed that HIV-1-exposed CD4<sup>+</sup> T cells upregulated membrane TRAIL. Finally, to confirm our results, we used a plasma membrane marker to determine TRAIL expression. Unstimulated or HIV-exposed CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-TRAIL antibodies (green), anti-CD4 antibodies (red) and DAPI (blue). As shown in Fig. 3C, TRAIL protein was revealed in

the intracellular compartment and did not colocalize with CD4 in unstimulated cells. In contrast, HIV-activated CD4<sup>+</sup> T cells harbored both intracellular and plasma membrane TRAIL expression. We showed that TRAIL and CD4 colocalized (yellow spots) in HIV-activated cells.

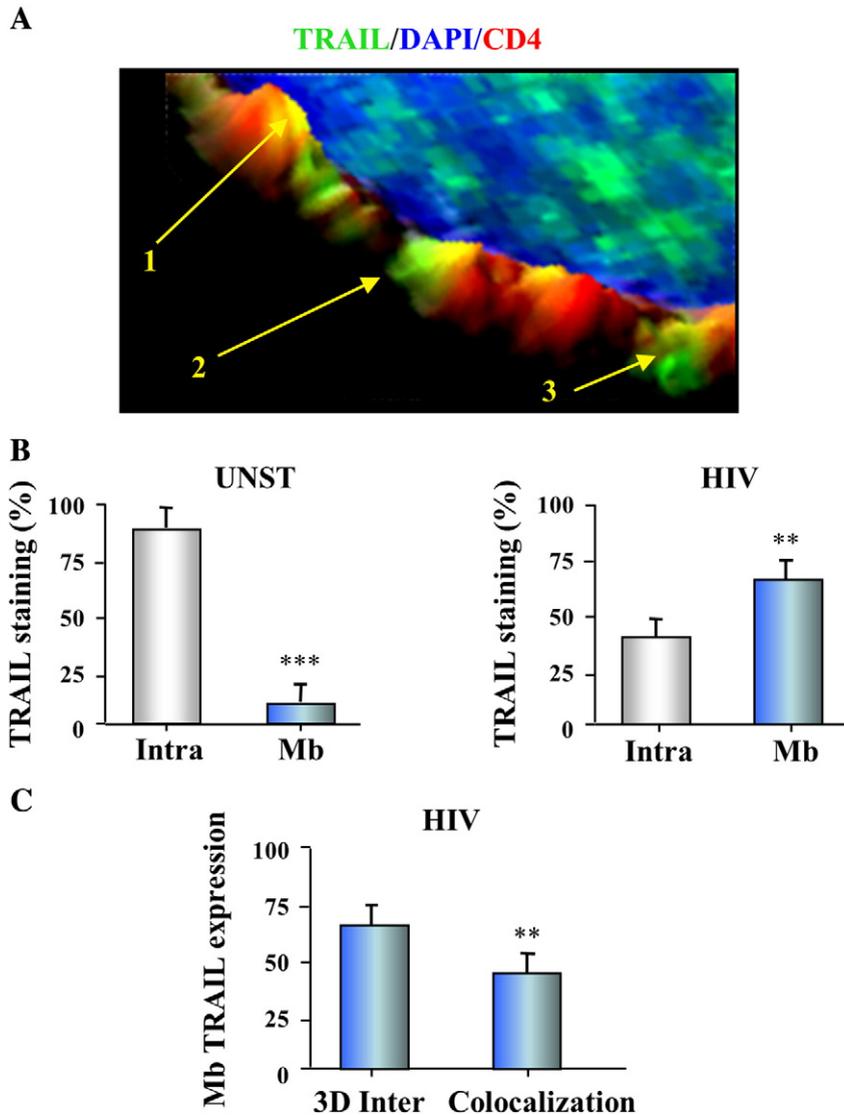
Thus, we quantified the number of CD4<sup>+</sup> T cells (n = 50) in 3 independent experiments that expressed only intracellular TRAIL and intracellular and membrane TRAIL. As shown in Fig. 3D, 82% of unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells only expressed intracellular TRAIL, and 18% of the cells expressed membrane TRAIL (p = 0.002). In contrast, 80% of HIV-exposed CD4<sup>+</sup> T cells expressed membrane (and intracellular) TRAIL and 20% only expressed intracellular TRAIL (p = 0.0001). It should be noted that all the CD4<sup>+</sup> T cells expressing membrane TRAIL also expressed intracellular TRAIL.

### 3.4. Quantification of membrane TRAIL by 3D interactive surface plot

Previous data of Fig. 3 demonstrated that HIV induced a relocalization of TRAIL from the intracellular compartment to the plasma membrane. Surprisingly, by analyzing more precisely TRAIL and CD4 colocalization, we observed that some TRAIL staining was localized on cell membrane but did not colocalize with CD4 (yellow arrow 2 and 3) (Fig. 4A). Thus, these staining dots of membrane TRAIL would appear as negative by using classic 3D microscopy colocalization software. We performed TRAIL expression quantification of 50 cells per condition by counting the number of intracellular and membrane TRAIL spots (Fig. 4B). Unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells mainly expressed TRAIL in their intracellular compartment (89%, p = 0.0009) in contrast to HIV-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells in which expressed 65% of TRAIL was localized on the membrane and 35% in the intracellular compartment (p = 0.002). Thus, HIV stimulation induced a changed of the TRAIL membrane/intracellular ratio, in favor of the membrane.

Finally, we quantified membrane TRAIL expressed by HIV-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells using the 3D interactive surface plot and the CD4/TRAIL colocalization method (ImageJ software). As previously described in Fig. 4B, 65% of TRAIL was localized on plasma membrane when using 3D interactive surface plot method (Fig. 4C). In contrast, we statistically found less TRAIL protein on cell membrane when we quantified using the CD4/TRAIL colocalization method. Indeed, only 48% (versus 65%, p = 0.0025) of TRAIL was found to colocalize with membrane CD4. Intuitively this result could have been predicted, as we observed in Fig. 4A some “false negative” TRAIL staining. Yellow arrows 2 and 3 highlighted TRAIL dots localized on the plasma membrane but that do not colocalize with CD4.

**Fig. 3.** TRAIL expression study using 3D interactive surface plot in CD4<sup>+</sup> T cells. Purified CD4<sup>+</sup> T cells were cultured overnight in the absence or presence of HIV. TRAIL expression by CD4<sup>+</sup> T cells was analyzed by 3D microscopy and acquired using bright light. A: unstimulated (UNST) or HIV-1-activated (HIV) CD4<sup>+</sup> T cells were stained with anti-TRAIL (green) and acquired without (left panels) or with bright light (right panels). Yellow squares represent our selection of CD4<sup>+</sup> T cells that will be studied in detail. B: 3D interactive surface plot of CD4<sup>+</sup> cells selected in 3A using bright light. Left panel shows intracellular TRAIL (green) expression in unstimulated cells. The plasma membrane (grey) does not harbor TRAIL staining. Right panel shows membrane TRAIL expression (green) by HIV-1-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells. C: 3D interactive surface plot of CD4<sup>+</sup> T cells using membrane marker CD4 (red). Left panel shows intracellular TRAIL staining (green) by unstimulated CD4<sup>+</sup> T cells. Colocalization between CD4 and TRAIL are not observed in unstimulated cells. Right panel shows membrane TRAIL expression (green), which colocalized (yellow) with membrane marker CD4 (red). D: quantification of the number of CD4<sup>+</sup> T cells (unstimulated and HIV-activated) expressing intracellular or membrane TRAIL using 3D interactive surface plot. P values (p) were determined using a two-tailed Student's *t* test. p < 0.05 one star, p < 0.01 two stars, p < 0.001 three stars.



**Fig. 4.** TRAIL localization and quantification using 3D interactive surface plot. **A:** 3D interactive surface plot of an HIV-1-activated CD4<sup>+</sup> T cell stained with TRAIL (green), DAPI (blue) and CD4 (red). Yellow arrow 1 shows a colocalization dot between CD4 and TRAIL staining. Arrows 2 and 3 show that TRAIL localized on the membrane but that do not colocalize with CD4. **B:** TRAIL expression quantification of HIV-1-activated CD4<sup>+</sup> T cells (n=50) by counting the number of intracellular and membrane TRAIL spots. **C:** Quantification of membrane TRAIL expressed by HIV-1-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells (n=50) using the 3D interactive surface plot and the CD4/TRAIL colocalization method (ImageJ software). The colocalization method was performed by counting the number of yellow spots (colocalization plugin of ImageJ). 3D interactive surface plot method quantified membrane TRAIL spots (yellow and green). P values (p) were determined using a two-tailed Student's *t* test. p<0.05 one star, p<0.01 two stars, p<0.001 three stars.

Thus, membrane visualization by 3D interactive surface plot provides a new tool to visualize protein localization avoiding false negative results and thus could constitute a helpful support to classical methods especially in human primary cells.

#### 4. Conclusion

The pro-apoptotic ligand TRAIL is expressed by many immune cells during HIV-1 infection including monocytes

(Herbeuval et al., 2005a), plasmacytoid dendritic cells (Hardy et al., 2007; Stary et al., 2009), NK (Melki et al., 2009) and T cells (Herbeuval et al., 2005c; Lum et al., 2005). The release of TRAIL during HIV-1 transmission occurs very early at the onset of plasma viremia (Gasper-Smith et al., 2008), and TRAIL is expressed in lymphoid tissues where the massive CD4<sup>+</sup> T cell depletion occurs (Guadalupe et al., 2003; Stary et al., 2009). Tonsils from patients under antiretroviral therapy (ART) showed reduced expression of TRAIL compared to untreated HIV-positive patients (Herbeuval et al., 2009), and

poor CD4<sup>+</sup> T cell recovery in response to ART has been associated with higher TRAIL receptor expression (Hansjee et al., 2004). These *in vitro* and *in vivo* results establish a potential crucial role of TRAIL in HIV immunopathogenesis (Herbeuval and Shearer, 2006; Cummins and Badley, 2010). Thus, mechanism understanding TRAIL regulation and expression appeared to be central to better define its role during infection.

Human primary T cells are characterized by a voluminous nucleus and a relatively small cytoplasm making intracellular localization of proteins difficult. Flow cytometry data showed that HIV-1 induced membrane TRAIL expression on CD4<sup>+</sup> T cells, in accordance with previous studies (Herbeuval et al., 2005c; Lum et al., 2005). Surprisingly, intracellular staining revealed that HIV-1 did not statistically increase the number of TRAIL expressing cells. Approximately 40% of cells were positive for intracellular TRAIL, irrespective of the activation state, suggesting that unstimulated T cells stocked TRAIL protein in the cytoplasm. This stockade of TRAIL protein in resting cells was also in favor of a relocation of TRAIL from the intracellular compartment to the plasma membrane under HIV stimulation.

Thus, to better characterize TRAIL expression in CD4<sup>+</sup> T cells, we performed 3D microscopy experiments using anti-TRAIL antibodies and a nucleus marker (DAPI). Confirming our flow cytometry results, we found TRAIL protein in HIV-1-exposed and also in resting CD4<sup>+</sup> T cells. The use of the nuclear marker DAPI allowed us to show that TRAIL protein was not intra-nuclear, due to the absence of DAPI and TRAIL colocalization, but was not sufficient to precisely determine whether TRAIL was at the membrane or in the cytoplasm. Indeed, TRAIL expression profile in HIV-1-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells was very similar to unstimulated cells, even if TRAIL appeared to be decreased in the cytoplasm at the expense of “peripheral” TRAIL. However, it remained impossible to clearly characterize TRAIL expression without the use of a membrane marker.

Thus, we developed a new method to visualize plasma membrane from 3D microscopy pictures using ImageJ software. Our method is based on the visualization of the plasma membrane by doing microscopic cell acquisition using bright light. Thus using a plugin of the ImageJ software, the 3D interactive surface plot, we performed analysis of microscopy data. 3D interactive surface plot allowed interpretation of the luminance of each pixel as the height for the plot. An adjustment of the lightning condition improves the visibility of small differences. The analysis of 3D microscopy data acquired with bright light using 3D interactive surface plot allowed us to visualize the plasma membrane in 3 dimensions due to its differential light reflection properties compared to extra- and intra-cellular compartments. Consequently, we were able to visualize plasma membrane proteins. Using this new method, we found that TRAIL was mainly stocked in the intracellular compartment of CD4<sup>+</sup> T cells. In contrast, when cells were exposed to HIV-1, CD4<sup>+</sup> T cells expressed TRAIL on their membrane. These results were confirmed by the use of plasma membrane markers (CD4, Vybrant), which colocalized with TRAIL only in HIV-1-activated cells. Our method of membrane visualization by 3D interactive surface plot offers several advantages. First, it saves the use of a plasma membrane marker in favor of intracellular markers. This remains very useful especially in human T cells that harbor very small cytoplasm.

Second, this 3D representation of microscopic images avoid “false negative” counting. Indeed, we observed that some TRAIL protein localized on the plasma membrane but that did not colocalize with CD4. This TRAIL staining would not be counted by classical colocalization quantification method.

However, there are a few limitations of current imaging technologies. Currently, the closest microscope to the 3D one is the confocal microscope. With this technique we can observe different stacks of cells using fluorescence and identify colocalized spots. But the step between each stack is greater. Indeed, with the confocal microscope, we obtain a dozen stacks, which reduces precision with 3D reconstruction whereas with the 3D microscopy, we obtain around 40 stacks per cell. Each acquisition for each color takes up to several minutes whereas we obtain instantaneous pictures with the 3D microscope.

Thus, 3D interactive surface plot membrane visualization provides a new tool that could be used in addition to classical methods to improve precise protein localization.

## Acknowledgments

The authors greatly acknowledge the Nikon Imaging Centre@curie.fr (Institut Curie-CNRS (<http://nimce.curie.fr>), Paris, France) and the PICT-IBISA Imaging Facility (<http://pict-ibisa.curie.fr>). We thank the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA (ANRS), Sidaction and international contract CNRS/FIOCRUZ for the financial support. We also thank Dr Sylvie Dufour (Institut Curie, Paris France) for her technical help. We greatly appreciate the help of Dr. J. D. Lifson (SAIC-NCI, Frederick, MD) and Julian Bess (SAIC-NCI, Frederick, MD) for providing purified AT-2 and live HIV-1<sub>MN</sub> particles.

## Author contributions

C.G. performed and analyzed the research. J.P.H designed and analyzed the research and wrote the paper. L. S, C. F. K. and M. G. provided new technologies. The authors declare no conflict of interest.

## References

- Ashkenazi, A., Herbst, R.S., 2008. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J. Clin. Invest.* 118, 1979.
- Colisson, R., Barblu, L., Gras, C., Raynaud, F., Hadj-Slimane, R., Pique, C., Hermine, O., Lepelletier, Y., Herbeuval, J.P., 2010. Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocation in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 115, 2177.
- Cummins, N.W., Badley, A.D., 2010. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010. *Cell Death Dis.* 1, e99.
- Ehrlich, S., Infante-Duarte, C., Seeger, B., Zipp, F., 2003. Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine* 24, 244.
- Gasper-Smith, N., Crossman, D.M., Whitesides, J.F., Mensali, N., Ottinger, J.S., Plonk, S.G., Moody, M.A., Ferrari, G., Weinhold, K.J., Miller, S.E., Reich III, C.F., Qin, L., Self, S.G., Shaw, G.M., Denny, T.N., Jones, L.E., Pisetsky, D.S., Haynes, B.F., 2008. Induction of plasma (TRAIL), TNFR-2, Fas ligand, and plasma microparticles after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission: implications for HIV-1 vaccine design. *J. Virol.* 82, 7700.
- Griffith, T.S., Lynch, D.H., 1998. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 559.
- Guadalupe, M., Reay, E., Sankaran, S., Prindiville, T., Flamm, J., McNeil, A., Dandekar, S., 2003. Severe CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 77, 11708.
- Hansjee, N., Kaufmann, G.R., Strub, C., Weber, R., Battegay, M., Erb, P., 2004. Persistent apoptosis in HIV-1-infected individuals receiving potent

- antiretroviral therapy is associated with poor recovery of CD4 T lymphocytes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 36, 671.
- Hardy, A.W., Graham, D.R., Shearer, G.M., Herbeuval, J.P., 2007. HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by toll-like receptor 7-induced IFN- $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17453.
- Herbeuval, J.P., Shearer, G.M., 2006. HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin. Immunol.* 123, 121.
- Herbeuval, J.P., Lambert, C., Sabido, O., Cottier, M., Fournel, P., Dy, M., Genin, C., 2003. Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 611.
- Herbeuval, J.P., Boasso, A., Grivel, J.C., Hardy, A.W., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Chougnnet, C., Lifson, J.D., Shearer, G.M., 2005a. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its *in vitro* production by antigen-presenting cells. *Blood* 105, 2458.
- Herbeuval, J.P., Grivel, J.C., Boasso, A., Hardy, A.W., Chougnnet, C., Dolan, M.J., Yagita, H., Lifson, J.D., Shearer, G.M., 2005b. CD4<sup>+</sup> T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 106, 3524.
- Herbeuval, J.P., Hardy, A.W., Boasso, A., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., Shearer, G.M., 2005c. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4<sup>+</sup> T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13974.
- Herbeuval, J.P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A.W., Kruhlak, M.J., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., Andersson, J., Shearer, G.M., 2006. Differential expression of IFN- $\alpha$  and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7000.
- Herbeuval, J.P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A.W., Vaccari, M., Cecchinato, V., Valeri, V., Franchini, G., Andersson, J., Shearer, G.M., 2009. HAART reduces death ligand but not death receptors in lymphoid tissue of HIV-infected patients and simian immunodeficiency virus-infected macaques. *AIDS* 23, 35.
- Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Eto, H., Okumura, K., Yagita, H., 1999. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J. Exp. Med.* 189, 1451.
- Lichtner, M., Maranon, C., Vidalain, P.O., Azocar, O., Hanau, D., Lebon, P., Burgard, M., Rouzioux, C., Vullo, V., Yagita, H., Rabourdin-Combe, C., Servet, C., Hosmalin, A., 2004. HIV type 1-infected dendritic cells induce apoptotic death in infected and uninfected primary CD4 T lymphocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 175.
- Lum, J.J., Schnepfle, D.J., Badley, A.D., 2005. Acquired T-cell sensitivity to TRAIL mediated killing during HIV infection is regulated by CXCR4-gp120 interactions. *AIDS* 19, 1125.
- Melki, M.T., Saidi, H., Dufour, A., Olivo-Marin, J.C., Gougeon, M.L., 2009. Escape of HIV-1-infected dendritic cells from TRAIL-mediated NK cell cytotoxicity during NK-DC cross-talk—a pivotal role of HMGB1. *PLoS Pathog.* 6, e1000862.
- Miura, Y., Misawa, N., Maeda, N., Inagaki, Y., Tanaka, Y., Ito, M., Kayagaki, N., Yamamoto, N., Yagita, H., Mizusawa, H., Koyanagi, Y., 2001. Critical contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4(+) T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID Mice. *J. Exp. Med.* 193, 651.
- Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., Ogasawara, K., 2001. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN- $\alpha$ /beta. *Eur. J. Immunol.* 31, 3138.
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., Goddard, A.D., Godowski, P., Ashkenazi, A., 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277, 818.
- Sibarita, J.B., 2005. Deconvolution microscopy. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 95, 201.
- Smyth, M.J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltout, R.H., Sedger, L.M., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K., 2001. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J. Exp. Med.* 193, 661.
- Stary, G., Klein, I., Kohlhofer, S., Koszik, F., Scherzer, T., Mullauer, L., Quendler, H., Kohrgruber, N., Stingl, G., 2009. Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4<sup>+</sup> T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* 114, 3854.
- Tecchio, C., Huber, V., Scapini, P., Calzetti, F., Margotto, D., Todeschini, G., Pilla, L., Martinelli, G., Pizzolo, G., Rivoltini, L., Cassatella, M.A., 2004. IFN $\alpha$ -stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood* 103, 3837.
- van Grevenynghe, J., Cubas, R.A., Noto, A., DaFonseca, S., He, Z., Peretz, Y., Filali-Mouhim, A., Dupuy, F.P., Procopio, F.A., Chomont, N., Balderas, R.S., Said, E.A., Boulassel, M.R., Tremblay, C.L., Routy, J.P., Sekaly, R.P., Haddad, E.K., 2011. Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J. Clin. Invest.* 121, 3877.
- Vidalain, P.O., Azocar, O., Lamouille, B., Astier, A., Rabourdin-Combe, C., Servet-Delprat, C., 2000. Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J. Virol.* 74, 556.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., et al., 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald III, E.R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G., el-Deiry, W.S., 1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* 17, 141.

### **8.3 Anexo 3: Cópia do termo de consentimento assinado pelos participantes do estudo**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Instituição:** Fundação Oswaldo Cruz-IOC e Centro Especializado em Doenças Infecciosas - Parasitárias (CEDIP), Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

**Projeto de Pesquisa:** IMUNOPATOLOGIA DA DENGUE: Envolvimento da imunidade inata e adaptativa na imunopatologia da infecção pelo Dengue

**Investigadores:** Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, DRA. LUZIA MARIA DE OLIVEIRA PINTO, DRA. ELZINANDES LEAL AZEREDO, DRA. CLAIRE FERNANDES KUBELKA.

**Objetivo da Pesquisa:** ESTUDAR A DOENÇA DA DENGUE PARA MELHORAR OS TRATAMENTOS E AJUDAR O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA EFICAZ.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado de que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre minha doença, que se chama DENGUE. **MINHA PARTICIPAÇÃO SERÁ APENAS PARA DOAR SANGUE DURANTE OU APÓS MEU ATENDIMENTO MÉDICO.** Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão no futuro beneficiar outras pessoas com esta doença.

O procedimento será o seguinte: **UM VOLUME DE 5 ML OU DE 20 ML SANGUE** será obtido por punção da veia do antebraço, no mesmo momento em que for coletado sangue **PARA DOSAGEM DE PLAQUETAS E HEMATÓCRITO NECESSÁRIOS PARA CONHECER E CONTROLAR A GRAVIDADE DO MEU ESTADO. SEREI SOLICITADO A DOAR 5 OU 20 ML SANGUE UMA VEZ APÓS A RECUPERAÇÃO (ENTRE 1 A 2 MESES) COM A FINALIDADE DE CONFIRMAR A NORMALIDADE DOS EXAMES LABORATORIAIS.**

**FOI-ME EXPLICADO QUE ESTA QUANTIDADE DE SANGUE REPRESENTA UMA PEQUENA PORÇÃO DO QUE POSSUO E SUA RETIRADA NÃO VAI ME PREJUDICAR.**

A retirada do sangue será feita por um enfermeiro ou técnico do CEDIP. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouxidão) no local da punção, com duração de 3 a 5 dias. Todos os cuidados serão tomados, como uso de seringa, agulha e gaze descartáveis e álcool para assepsia local, entre outros. Quanto aos exames e procedimentos não foram identificados riscos até o momento.

Os resultados deste estudo serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos ser divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto não será permitida a minha identificação, o que garante a minha privacidade.

O pesquisador responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contactar os demais pesquisadores envolvidos neste estudo.

**MINHA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO É INTERAMENTE VOLUNTÁRIA, E SOU LIVRE PARA RECUSAR A PARTICIPAR NO ESTUDO, OU ME RETIRAR EM QUALQUER FASE DA PESQUISA SEM QUE ISSO POSSA AFETAR OU PREJUDICAR O CUIDADO MÉDICO A QUE DEVO RECEBER.**

Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos acima sejam realizados na minha pessoa.

Nome : \_\_\_\_\_

Eu, Responsável pelo menor acima identificado, autorizo sua participação, como voluntário (a) no presente projeto de pesquisa.

Data: \_\_\_\_\_

Nome : \_\_\_\_\_

Assinatura : \_\_\_\_\_

Pesquisadores: Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto (021) 8755-7771  
Dra. Elzinandes L Azeredo (021) 7183-9093

**Projeto Dengue**  
**Laboratório de Imunologia Viral - FIOCRUZ**  
**Mato Grosso do Sul - 2013**

**IDENTIFICAÇÃO**

Nome: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_  
 Sexo: ( ) Masc ( ) Fem Data de Nascimento: \_\_/\_\_/\_\_\_\_  
 Data Entrevista: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ Data Internação: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Gestante: ( ) Sim ( ) Não Dengue anterior: ( ) Sim ( ) Não  
 Vacina: ( ) Febre amarela <10 anos ( ) Rubéola/triviral  
 Outros: \_\_\_\_\_

**HISTÓRIA CLÍNICA**

**Comorbidades:**

|                   |                   |                   |           |                      |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|----------------------|
| Diabetes mellitus | DPOC              | Asma brônquica    | rinite    | Hipertensão arterial |
| Doença cardíaca   | Doença falciforme | Doença auto-imune | Tabagismo | Outros               |

Doença viral crônica? Quais?

Faz uso de medicamentos contínuos? Especificar:

**Sintomas suspeitos de dengue**

|   |                   |           |          |                         |               |                       |
|---|-------------------|-----------|----------|-------------------------|---------------|-----------------------|
| Febre<br>Data de Início da Febre:<br>__/__/__ | Prostação/Astenia | Calafrios | Cefaléia | Mialgia                 | Dor lombar    | Artralgia             |
| Dor Retro-Ocular ao movimento do globo ocular | Dor de garganta   | Tosse     | Náuseas  | Vômitos                 | Dor Abdominal | Diarréia              |
| Epigastralgia                                 | Tontura/Vertigem  | Exantema  | Prurido  | Adenomegalias cervicais | Icterícia     | Hiperemia conjuntival |

Outros

**Atenção para os Sinais de Alarme**

|                           |                        |                      |                          |                  |                 |                     |
|---------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|------------------|-----------------|---------------------|
| Dor Abdominal persistente | Sangramento espontâneo | Sangramento volumoso | Vômitos persistentes     | Hepatomegalia    | Derrame Pleural | Derrames Pericárdio |
| Ascite                    | Hipotensão Postural    | Hipotensão Arterial  | Desconforto respiratório | Hemoconcentração | Diarréia        |                     |

Outros

**Manifestações Hemorrágicas**

|               |           |               |          |             |
|---------------|-----------|---------------|----------|-------------|
| Prova do laço | Petéquias | Gengivorragia | Epistaxe | Metrorragia |
| Outras        |           |               |          |             |

**LABORATORIAL**

1° HT: \_\_\_\_\_ 1° Plaqueta: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
2° HT: \_\_\_\_\_ 2° Plaqueta: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
último HT: \_\_\_\_\_ última Plaqueta: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Anexar dados do hemograma e bioquímica

**Outras informações:**