

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Estudo da Susceptibilidade e Resposta de Linfócitos Humanos ao Vírus da Dengue

Guilherme Ferreira Silveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências área de concentração Biociências

Orientador: Dr. Juliano Bordignon

Co-orientadora: Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos

CURITIBA
Abril/2014

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

S587 Silveira, Guilherme Ferreira

Estudo da susceptibilidade e resposta de linfócitos humanos ao vírus da dengue / Guilherme Ferreira Silveira. – Curitiba, 2014.

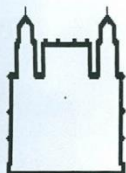
xii, 106 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2014.

Bibliografia: f. 93-106

1. Linfócitos humanos. 2. Vírus da dengue. 3. Linfócitos T CD8+. 4. Linfócitos T CD4+. 5. Linfócitos B CD19+. 6. Resposta imune funcional. 7. Infecção. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Carlos Chagas
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia



Instituto Carlos Chagas

Ata da Sessão Pública de exame de tese para obtenção do grau de **Doutor** em Biociências e Biotecnologia.

Aos 30 dias do mês de abril de dois mil e quatorze, às oito horas e trinta minutos, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Marco Augusto Stimamiglio, Dra. Silvia Beatriz Boscardin e Dr. Anderson de Sá Nunes, com a finalidade de julgar a tese do(a) candidato(a) **Guilherme Ferreira Silveira**, intitulada: “**Estudo da Susceptibilidade e Resposta de Linfócitos Humanos ao Vírus da Dengue**”, sob a orientação de **Juliano Bordignon** e **Claudia Nunes Duarte dos Santos**, para obtenção do grau de Doutor em Biociências e Biotecnologia. O(a) candidato(a) teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dr. Marco Augusto Stimamiglio**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

Aprovação da tese por unanimidade

Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

Reprovação da tese

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo(a) candidato(a).


Prof. Dr. Marco Augusto Stimamiglio
ICC / FIOCRUZ

Curitiba, 30 de abril de 2014


Prof. Dra. Silvia Beatriz Boscardin
USP / SP


Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
USP / SP

Candidato(a): 

Instituto Carlos Chagas – ICC – Fiocruz - PR
Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 – CIC
CEP 81350 010 – Curitiba – Paraná – Brasil. Tel: +55 41 3316-3230

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr. Juliano Bordignon e Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos, pela orientação, incentivo e apoio, por todo o ensinamento, dedicação e amizade, recebidos durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos pesquisadores do Instituto Carlos Chagas - ICC, Drs. Samuel Goldenberg, Stênio P. Fragoso, Marco A. Krieger, Maurílio José Soares, Claudia N. Duarte dos Santos, pelo empenho em sempre proporcionar as melhores condições de trabalho para todos os que buscam o Instituto Carlos Chagas.

À Dra. Priscilla F. Wowk, por toda a colaboração, pelas variadas discussões, pela atenção e presteza.

Aos Dr. Marco Stimamiglio, Daniel Santos Mansur, André Báfica, Silvia Boscardin, Anderson de Sá Nunes e João Marques pelas discussões e orientações a respeito deste trabalho.

Aos colegas do laboratório pelas inúmeras vezes em que me auxiliaram, em todos os momentos do desenvolvimento deste estudo.

Ao apoio financeiro da FIOCRUZ, CNPq, PROCAD, Fundação Araucária, e RIVE-CYTED.

Ao Udo, James, Lemmy, Tom e Kerry, Dio, Dany e a Marchha.

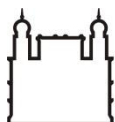
Guilherme Ferreira Silveira

Esta tese é dedicada à minha esposa Cecília, aos meus pais Nailon e Luiza, aos meus irmãos e todos os familiares.

Em especial ao meu Avô, Seu Ferreira, um exemplo que sempre estará comigo.

The proper study of mankind is man.

A. Pope



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

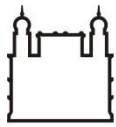
ESTUDO DA SUSCEPTIBILIDADE E RESPOSTA DE LINFÓCITOS HUMANOS AO VÍRUS DA DENGUE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Guilherme Ferreira Silveira

A dengue representa na atualidade a mais prevalente arbovirose, caracterizando-se como um grave problema de saúde pública, tanto no Brasil como em todo o mundo. No entanto, o paciente que desenvolve a febre da dengue e/ou dengue com complicações recebe apenas tratamento de suporte, uma vez que não existem medicamentos ou vacinas específicas contra o vírus. Adicionalmente, pouco se sabe sobre os mecanismos imunopatológicos que desencadeiam os sintomas graves. Um dos aspectos que parece ser chave na patogenia é a resposta funcional dos linfócitos ao vírus da dengue (DV). Embora, a susceptibilidade destas células à infecção pelo DV ainda não fora bem caracterizada. Deste modo, os alvos principais deste trabalho foram à determinação da susceptibilidade e a caracterização da resposta funcional de linfócitos humanos de doadores saudáveis, analisadas na infecção por cepas dos quatro sorotipos do DV. Foi demonstrado que três diferentes populações de linfócitos (LT CD4⁺, LT CD8⁺ e LB CD19⁺) são susceptíveis ao DV, especialmente o LT CD8⁺, sendo o heparan sulfato um receptor de entrada para a infecção destas células pelo DV. Esta infecção foi produtiva, com replicação ativa e liberação de partículas virais viáveis no sobrenadante das culturas, além da produção da proteína não-estrutural 1 (NS1). Contudo, foram observados apenas níveis discretos de ativação celular e produção de citocinas. Adicionalmente, não foram observadas respostas funcionais como: apoptose de linfócitos, degranulação de LT CD8⁺, infecção diferencial de LT CD8⁺ “naïve” ou LT CD8⁺ de memória, resposta de polarização Th1/Th17 de LT CD4⁺ ou produção de IgM anti-DENV por LB CD19⁺. Ademais, a infecção dos linfócitos não foi capaz de reduzir a proliferação celular observada em ensaios de Ensaio Misto de Leucócitos e Ensaio de “Prime” de Linfócitos, sendo observada uma discreta elevação na proliferação quando as células foram infectadas com o DV4 360. Do mesmo modo, as infecções de culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) pelas cepas DV3 98 e DV4 360 foram capazes de induzir uma polarização de perfil Th2. Portanto, estes achados demonstram que, apesar das infecções produtivas, os linfócitos são pouco responsivos aos DV, sendo que importantes funções destas células não foram reguladas pela infecção. Desta forma, é possível sugerir que os linfócitos seriam uma fonte importante para a manutenção da viremia observada nos casos de dengue.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

SUSCEPTIBILITY AND RESPONSE OF HUMAN LYMPHOCYTES TO DENGUE VIRUS

ABSTRACT - PhD THESIS

Guilherme Ferreira Silveira

Dengue fever is the most prevalent arboviral disease, characterized as a serious public health problem, both in Brazil and worldwide. The patient who develops dengue fever, which could culminate in severe complications, receives only live-support therapy, since there are no specific drugs or vaccines against the virus. Furthermore, little is known about the immunopathogenic mechanisms that trigger the severe symptoms in dengue. One aspect that seems to be key in the pathogenesis is the functional response of lymphocytes to the dengue (DV) infection. The susceptibility of these cells to DV infection is not well characterized. Therefore, the main targets of this study were the determination of *ex vivo* susceptibility by DV infection and the characterization of functional response of human lymphocytes. Cells from healthy donors were analyzed against four DV serotypes. It has been shown that three populations of lymphocytes (LT CD4⁺, LT CD8⁺ and LB CD19⁺) are susceptible to DV, especially LT CD8⁺, infection by DV which occurs through the participation of heparan sulfate as the receptor. Infection was productive, with active replication and release of viable viral particles and NS1 protein in the culture supernatants. Only discrete levels of cellular activation and cytokine production were observed. In addition, lymphocyte apoptosis, LT CD8⁺ degranulation, differential infection of naïve or memory LT CD8⁺, LT CD4⁺ polarization (Th1/Th17) or production of IgM anti-DENV by LB CD19⁺ were not modulated. Furthermore, the infection of the lymphocytes was not able to reduce cell proliferation induced in Mixed Leukocyte Reaction and Lymphocytes Prime Assay, showing a slight increase in proliferation when the cells were infected with DV4 360. PBMC infection with DV3 98 and DV4 360 strains was able to induce a Th2 polarized response. These findings suggest that, despite the productive infection, lymphocytes are poor responders to DV, and important functions of these cells were not modulated by DV infection. However, it is possible that lymphocytes would be an important source for maintenance of viremia observed in dengue fever.

Lista de Abreviaturas:

4G2 – anticorpo monoclonal murino anti-proteína E de Flavivirus;
ADE – Potencialização Dependente de Anticorpos, do inglês “Antibody dependent enhancement”;
APC – Células Apresentadoras de Antígenos, do inglês “Antigen Presenting Cells”;
BSA – Albumina do Soro Bovino, do inglês “Bovine Serum Albumin”;
C6/36 – Células de estágio larval de Aedes albopictus;
CD – Cluster de Diferenciação;
CMC – Carboximetilcelulose;
DC – Células Dendríticas, do inglês “Dendritic Cells”;
DV – Vírus da Dengue, do inglês “Dengue Virus”;
DV1 BR90 – Vírus dengue sorotipo 1 cepa BR/90;
DV2 265 – Vírus dengue sorotipo 2 cepa ICC265;
DV3 98 – Vírus dengue sorotipo 3 cepa 98-04;
DV4 360 – Vírus dengue sorotipo 4 cepa TVP360;
E – Proteína do Envelope Viral;
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético;
EML – Ensaio Misto de Leucócitos;
EPL – Ensaio de “Prime” de Linfócitos;
FD – Febre da Dengue;
FHD – Febre Hemorrágica da Dengue;
GM-CSF – fator estimulante de colônias de monócitos e granulócitos;
IFN – Interferon;
IL – Interleucina;
imdDCs – células dendríticas imaturas derivadas de monócitos, do inglês “immature monocyte derived Dendritic Cells”;
LB – Linfócitos B;
LC – Células de Langerhans, do inglês “Langerhans Cells”;
LT – Linfócitos T;
MFI – intensidade média de fluorescência, do inglês “Mean Fluorescence Intensity”;
MOI – Multiplicidade de Infecção, do inglês “Multiplicity of Infection”;
NS – Proteína Não Estrutural Viral, do inglês “nonstructural”;
P.B.E. – Tampão PBS/BSA/EDTA
PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico, do inglês “Peripheral Blood Mononuclear Cells”;
PBS – Tampão Fosfato Salino, do inglês “Phosphate Buffered Saline”;
SCD – Síndrome do Choque da Dengue;
SFB – Soro Fetal Bovino;
SNP – Polimorfismo de Simples Nucleotídeos, do inglês “Single Nucleotide Polymorphism”;
T.A. – Temperatura Ambiente;
TB – Tampão de Bloqueio;
TCR – Receptores de Células T, do inglês “T Cell Receptor”;
TGF- β – Fator beta de Crescimento e Transformação, do inglês “Transforming growth factor beta”;
TNF – Fator de Necrose Tumoral;
WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês “World Health Organization”;

Lista de Figuras:

<i>Figura 1.1 – Cinética de infecção pelo DV e da resposta do hospedeiro.</i>	6
<i>Figura 1.2 – Fenômeno de Potencialização Dependente de Anticorpos – ADE.</i>	9
<i>Figura 1.3 – Fenômeno do Pecado Antigênico Original.</i>	11
<i>Figura 4.1 – Estratégia de análise para a determinação da infecção relativa em subpopulações de PBMC.</i>	39
<i>Figura 4.2 – Diferentes populações em PBMC são infectadas por cepas dos quatro sorotipos do DV.</i>	40
<i>Figura 4.3 – Diferentes populações em linfócitos totais são infectadas por cepas dos quatro sorotipos do DV.</i>	41
<i>Figura 4.4 – Enriquecimento por “cell-sorting” das diferentes sub-populações de PBMC.</i>	43
<i>Figura 4.5 – Diferentes populações de linfócitos (CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺) são infectadas pelo DV em culturas enriquecidas por “cell-sorting”.</i>	44
<i>Figura 4.6 – A infecção de diferentes populações de linfócitos pelo DV é produtiva, em culturas enriquecidas após “cell sorting”.</i>	46
<i>Figura 4.7 – O tratamento das diferentes cepas de DV com heparina diminui a porcentagem de infecção dos linfócitos humanos.</i>	48
<i>Figura 4.8 – Linfócitos totais tratados com heparinase apresentam menor susceptibilidade à infecção pelo DV.</i>	49
<i>Figura 4.9 – A infecção pelo DV induz a produção de citocinas em culturas de PBMC.</i>	51
<i>Figura 4.10 – A infecção de linfócitos totais pelo DV induz a baixos níveis de ativação celular.</i>	53
<i>Figura 4.11 – A ativação de linfócitos por ConA diminui a susceptibilidade destas células pelo DV.</i>	54
<i>Figura 4.12 – Comparação entre as infecções de linfócitos totais tratados ou não com ConA para a susceptibilidade ao DV.</i>	55
<i>Figura 4.13 – Ativação e infecção de linfócitos tratados ou não tratados com PHA e infectados por DV.</i>	56
<i>Figura 4.14 – Ocorre a morte de monócitos mas não linfócitos após infecção pelo DV.</i>	58
<i>Figura 4.15 – A infecção pelo DV não modula negativamente a proliferação dos linfócitos no EML.</i>	60
<i>Figura 4.16 – A infecção dos linfócitos pelo DV não modula negativamente a proliferação celular no ensaio de “prime” de linfócitos.</i>	62
<i>Figura 4.17 – Não ocorre degranulação de linfócitos T CD8⁺ na infecção de linfócitos totais pelo DV.</i>	64
<i>Figura 4.18 – Enriquecimento de diferentes populações linfocitárias por “cell-sorting”.</i>	65
<i>Figura 4.19 – Os linfócitos T CD8⁺ “naïve” ou de memória possuem a mesma susceptibilidade ao DV.</i>	67
<i>Figura 4.20 – Não ocorre polarização Th1 após a infecção de linfócitos humanos pelo DV.</i>	69
<i>Figura 4.21 – Presença de células Th2 em culturas de PBMC infectadas pelo DV.</i>	70
<i>Figura 4.22 – Não ocorre polarização Th17 após a infecção de linfócitos pelo DV.</i>	71
<i>Figura 4.23 – A infecção pelo DV não induz a secreção de IgM em linfócitos B CD19⁺.</i>	72

Lista de Diagramas e Tabelas:

<i>Diagrama 3.1 – Susceptibilidade de células humanas pelos DV.</i>	22
<i>Diagrama 3.2 – Receptores de entrada viral em populações linfocitárias.</i>	26
<i>Diagrama 3.3 – Efeito da ativação celular na infecção pelo DV.</i>	27
<i>Diagrama 3.4 – Efeito do DV na proliferação de linfócitos durante o EML.</i>	30
<i>Diagrama 3.5 – Efeito do DV na proliferação de linfócitos durante o EPL.</i>	31
<i>Diagrama 3.6 – Efeito do DV na degranulação de linfócitos T CD8⁺.</i>	32
<i>Diagrama 3.7 – Polarização de linfócitos T CD4⁺ após infecção por DV.</i>	34
<i>Diagrama 3.8 – Infecção pelo DV e secreção de granzima em linfócitos T CD8⁺.</i>	35
<i>Diagrama 3.9 – Infecção pelo DV e da secreção de IgM em linfócitos B CD19⁺.</i>	36
<i>Diagrama 6.1 – Sumário do estudo da susceptibilidade e resposta de linfócitos humanos ao vírus da dengue.</i>	82
<i>Diagrama 6.2 – Hipótese do efeito da infecção de linfócitos humanos pelo DV na patogenia da dengue.</i>	84
<i>Tabela 1.1 – Descrição das proteínas codificadas pelo genoma do vírus da dengue e de suas principais funções durante o ciclo viral.</i>	3
<i>Tabela 3.1 – Características dos iniciadores utilizados nos ensaios de replicação.</i>	25

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia da dengue	1
1.2 O vírus da dengue	2
1.3 Patogenia da dengue	3
1.4 Imunopatogenia da dengue	5
1.4.1 Resposta de linfócitos B CD19 ⁺ – ADE	7
1.4.2 Resposta de linfócitos T CD8 ⁺ – Pecado Antigênico Original	9
1.4.3 Resposta de linfócitos T CD4	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos específicos	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Obtenção das PBMCs	18
3.1.1 Culturas de PBMC	18
3.1.2 Linfócitos totais	19
3.1.3 Populações enriquecidas por “cell-sorting”	20
3.2 Estoques virais e Infecções	20
3.3 Imunofenotipagem, marcação intracelular para DV	22
3.4 Determinação da proteína NS1	24
3.5 Replicação e progênie virais	24
3.6 Determinação do Receptor de Entrada do DV em Linfócitos Humanos	25
3.7 Determinação dos níveis de citocinas perfil Th1/Th2/Th17	26
3.8 Ativação celular	28
3.9 Morte Celular	28
3.10 Ensaio Misto de Leucócitos (EML)	29
3.11 Ensaio de “Prime” de Linfócitos (EPL)	30
3.12 Degranulação Celular	31
3.13 Polarização Th1/Th2/Th17	33
3.14 Infecções de populações de células CD8 ⁺ “naïve” e de memória	34
3.15 Produção de IgM contra DV por linfócitos B CD19 ⁺	35
3.16 Análises Estatística	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Linfócitos humanos são susceptíveis à infecção pelo DV	37

4.2	O heparan sulfato é um receptor de entrada do DV em linfócitos humanos	47
4.3	Resposta funcional de linfócitos T e B à infecção pelo DV	50
4.3.1	A produção de citocinas pelas PBMC infectadas pelo DV ocorre em baixos níveis	50
4.3.2	A infecção dos linfócitos pelo DV induz baixos níveis de ativação celular	52
4.3.3	A infecção pelo DV não induz linfócitos humanos à morte	57
4.3.4	A proliferação celular no EML não é reduzida após infecção pelo DV	59
4.3.5	A proliferação celular no EPL não é reduzida após infecção pelo DV	61
4.3.6	Degranulação de Linfócitos T CD8 ⁺ e secreção de granzima e perforina em culturas de linfócitos totais infectados pelo DV	63
4.4	Respostas específicas dos linfócitos induzidas pelo DV	65
4.4.1	DV infecta linfócitos T CD8 ⁺ de memória ou “naïve” de forma não-seletiva, não induzindo a produção de granzima	66
4.4.2	A infecção pelo DV induz a polarização ao perfil Th2	67
4.4.3	A infecção pelo DV não induz a secreção de IgM por linfócitos B CD19 ⁺	72
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÃO	82
7	PERSPECTIVAS	85
8	ANEXOS	86
8.1	Anexo I – Formulas dos reagentes	86
8.2	Anexo II – Lista das culturas	87
8.3	Anexo III – Autorização do CEP	90
8.4	Anexo IV – Artigos Publicados	91
9	BIBLIOGRAFIA	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da dengue

A Organização Mundial da Saúde (WHO) considera a dengue a doença viral transmitida por mosquitos mais prevalente em circulação atualmente (WHO , 2012b; Bhatt *et al.*, 2013). Estima-se que quatro bilhões de pessoas vivam em países sob o risco de contágio pelo vírus da dengue (DV) (Bhatt *et al.*, 2013; WHO 2013). Dados reportados sugerem que a dengue seja endêmica em 128 países, com 824 milhões de residências urbanas e 763 milhões peri-urbanas como potenciais reservatórios para o vetor (Brady *et al.*, 2012; Bhatt *et al.*, 2013). Apesar de hoje ser considerada uma enfermidade mundial, a região do sul asiático concentra 75% da população global exposta a dengue. As américas estão em segundo lugar, onde virtualmente todos os países sofrem com a hiperendemicidade do DV (WHO , 2012b). Já no continente europeu, apesar de pouco afetado, existe o risco real da ocorrência de um surto, tendo sido reportadas transmissões locais do DV na Croácia e na França em 2010 (WHO , 2012b; a).

A infecção pelo DV tem um importante impacto na economia dos países afetados. Estudos recentes demonstram que uma parcela significativa da organização financeira nos países localizados em áreas tropicais é afetada prioritariamente pela perda na capacidade produtiva dos indivíduos acometidos pela infecção (Shepard *et al.*, 2011; Shepard *et al.*, 2013). Nos países do sul asiático, o déficit anual chega a U\$ 950 milhões (Shepard *et al.*, 2013), já nas Américas este valor pode chegar a U\$ 2,1 bilhões (Shepard *et al.*, 2011), sendo que estes valores não levam em consideração os gastos com prevenção da doença e controle do mosquito vetor.

No Brasil, desde 1986, com a re-introdução do vírus após um período de ausência, até 2012, mais de 7 milhões de casos foram confirmados com mais de 2 mil óbitos (Siqueira *et al.*, 2005; S.V.S. e M.S., 2009). No período de 2000 a 2010, foi observada uma variação significativa na incidência da doença, com o pico ocorrendo em 2010, onde mais de 1 milhão de casos foram registrados (538/100.000 habitantes), e os menores índices em 2004, onde ocorreram aproximadamente 70 mil casos (62/100.000 habitantes). Um dos fatores que pode ter influenciado esta variação é a substituição do sorotipo prevalente em circulação no Brasil (Siqueira *et al.*, 2010). No ano de 2010 ocorreu no país a introdução do DV sorotipo 4 levando a

circulação simultânea com os outros três sorotipos do vírus (Acosta *et al.*, 2011). Já no período de 2010 a 2013, ocorreram mais de dois milhões de notificações sendo que destas, mais de sete mil casos foram considerados graves, com aproximadamente 1.330 óbitos registrados (PHO e WHO, 2013). Em 2013, a região Sudeste do Brasil foi responsável por 63,4% dos casos registrados, seguida pela região Centro-Oeste (18,4%), Nordeste (10,1%), Sul (4,8%) e Norte (3,3%) (PHO e WHO, 2013). No intuito de combater o avanço da epidemia no país, foram investidos aproximadamente R\$ 1,5 bilhões no período de 2000 a 2013, em medidas prioritariamente de vigilância sanitária (PHO e WHO, 2013). Contudo, devido à ineficiência da vigilância epidemiológica, com o baixo nível na elaboração de relatórios de acompanhamento, às dificuldades de diagnóstico e às análises comparativas inconsistentes, a verdadeira incidência e o impacto mundial da epidemia da dengue, provavelmente, são subestimados (Beatty *et al.*, 2011; Gubler, 2011; 2012).

1.2 O vírus da dengue

O agente etiológico da dengue é um vírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *flavivirus* sendo dividido em quatro sorotipos distintos (DV1, 2, 3 e 4) (Casals e Brown, 1953; 1954; Henchal *et al.*, 1982). Recentemente, foi apresentado em congresso internacional a descrição do DV sorotipo 5, isolado de um paciente na Ásia (Normile, 2013). A classificação dos sorotipos de DV baseia-se em ensaios de soro-neutralização, onde anticorpos presentes no soro de pacientes infectados reconhecem de forma distinta cada sorotipo do DV.

Assim como em outros *flavivirus*, os virions maduros de DV apresentam simetria icosaédrica e medem aproximadamente 50 nm de diâmetro. O genoma viral é composto por uma molécula de RNA de cadeia simples (ssRNA), e polaridade positiva (Russell *et al.*, 1970; Henchal e Putnak, 1990). O ssRNA viral de aproximadamente 11Kb possui um CAP na extremidade 5' e uma única fase de leitura aberta que codifica uma poliproteína precursora que quando clivada co- e pós-traducionalmente, gera três proteínas estruturais (capsídeo – C, precursora da proteína de membrana – prM/M e a proteína de envelope – E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (Chambers *et al.*, 1990). Cada uma das proteínas virais age de maneira distinta, participando da adsorção e entrada do vírus na célula hospedeira (função da proteína – E), realizando a

replicação e tradução do genoma viral, e a montagem e liberação das novas partículas virais para o meio extracelular (Perera e Kuhn, 2008; Rodenhuis-Zybert, Van Der Schaar, *et al.*, 2010; Rodenhuis-Zybert, Wilschut, *et al.*, 2010). As funções das proteínas virais, assim como das regiões não traduzidas do ssRNA viral, estão resumidas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Descrição das proteínas codificadas pelo genoma do vírus da dengue e de suas principais funções durante o ciclo viral. As funções seguidas de sinal de interrogação (?) foram demonstradas para algumas cepas.

UTR	3'	Replicação e tradução
Estruturais	C	Formação da ribonucleoproteína.
	prM	Chaperona.
	E	Interação com receptores, tropismo e fusão com membranas celulares.
Não-Estruturais	NS1	Associação à superfície celular e secreção no meio extracelular Replicação e antígeno solúvel capaz de fixar complemento
	NS2a	Replicação e Ligação ao 3' RNA, Inibição de IFN-I (?)
	NS2b	Cofator de protease
	NS3	Protease, helicase, NTPase, Inibição de IFN-I
	NS4a	Replicação e Montagem. Inibição de IFN-I.
	NS4b	Replicação, Inibição de IFN-I (?)
	NS5	RNA pol. Metiltransferase, Inibição de IFN-I
UTR	5'	Replicação e Tradução
Adaptado de: (Chambers <i>et al.</i> , 1990; Perera e Kuhn, 2008; Rodenhuis-Zybert, Van Der Schaar, <i>et al.</i> , 2010; Rodenhuis-Zybert, Wilschut, <i>et al.</i> , 2010)		

1.3 Patogenia da dengue

A infecção pelo DV causa um amplo espectro de formas clínicas, que vão da febre da dengue (FD) à dengue com complicações, a qual engloba a febre hemorrágica da dengue (FHD), podendo progredir para a síndrome de choque da dengue (SCD) e o óbito (Kuno *et al.*, 1998; Rothman e Ennis, 1999; Who, 2013). A FD é caracterizada por febre acompanhada por sintomas inespecíficos como cefaléia, artralgia, mialgia, náuseas, vômitos, dor retro-orbital e exantemas (W.H.O, 2009). Na FHD, além dos sintomas da FD, são observadas hemorragias, trombocitopenia, extravasamento de plasma, que são ocasionados pelo aumento da permeabilidade vascular (Malavige *et al.*, 2004; W.H.O, 2009). Este quadro pode se agravar rapidamente e o paciente entrar em choque hipovolêmico (SCD), podendo

evoluir para o óbito. Adicionalmente, algumas formas de dengue com complicações menos frequentes, porém com importância médica, como as manifestações neurológicas e viscerais, foram reconhecidas pela WHO (W.H.O, 2009).

Os mecanismos fisiopatológicos precisos que desencadeiam as formas graves de dengue ainda não foram totalmente descritos. Porém, alguns dados epidemiológicos demonstram que determinadas cepas de DV2 seriam mais prevalentes em casos de dengue com complicações (Sangkawibha *et al.*, 1984; Henchal e Putnak, 1990; Vaughn *et al.*, 2000). Além disso, fatores intrínsecos aos vírus, como eficiência de replicação (“fitness” viral), imunogenicidade de proteínas não estruturais e evasão da resposta imune inata pela ação de proteínas não estruturais parecem ser fatores importantes na patogenia da dengue (Pryor *et al.*, 2001). Algumas proteínas não estruturais são capazes de interagir com vias do sistema imune inato, particularmente bloqueando a produção de IFN do tipo I após a infecção. Esta inibição pode ocorrer, por exemplo, pelo bloqueio da fosforilação na via JAK-STAT pela NS4b (Munoz-Jordan *et al.*, 2003; Munoz-Jordan *et al.*, 2005), pela clivagem da proteína STING pelo complexo NS2B/3 (Rodriguez-Madoz *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2012) e pela degradação da proteína fosforilada STAT2 (pSTAT2) pela proteína NS5, impedindo sua translocação para o núcleo celular (Ashour *et al.*, 2009; Rajsbaum *et al.*, 2013).

Características do hospedeiro também podem influenciar nas manifestações clínicas da dengue. No sul da Ásia, fortes indícios apontam para um maior número de casos de dengue com complicações em crianças quando comparadas com as populações adultas (Guzman *et al.*, 2010). Fatores nutricionais como a desnutrição, já foram apontados como um complicador na patogenia da dengue (Thisyakorn e Nimmannitya, 1993; Kalayanarooj e Nimmannitya, 2005; Nguyen *et al.*, 2005). Doenças crônicas como diabetes (Limonta *et al.*, 2008), hipertensão (Pang *et al.*, 2012), asma atópica (Guzman *et al.*, 1992) e anemia falciforme (Moesker *et al.*, 2013), também podem ser fatores que contribuem para complicações na dengue. Fatores genéticos do hospedeiro como polimorfismos de simples nucleotídeo (SNP) para genes como dos antígenos leucocitários humanos (HLA) (Sierra *et al.*, 2007) e DC-SIGN (do inglês “Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin”) (DC-SIGN) (Sakuntabhai *et al.*, 2005), estão presentes em alguns pacientes tailandeses que manifestaram casos de dengue com complicações. Contudo, de todos os aspectos da infecção pelos DV, um dos mais relevantes na patogenia da dengue é a resposta adaptativa do hospedeiro à

infecção (Halstead e O'rourke, 1977; Mongkolsapaya *et al.*, 2003; Mongkolsapaya *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2007).

1.4 Imunopatogenia da dengue

Analisando aspectos imunopatológicos que podem contribuir para a FHD/SCD, é possível determinar que pacientes que desenvolvem dengue com complicações apresentam níveis séricos reduzidos de proteínas do sistema complemento quando comparados com pacientes que desenvolvem FD, indicando assim a possível participação desta via na lise de células endoteliais (Bokisch *et al.*, 1973; Malasit, 1987). Porém, dos fatores imunopatológicos que podem contribuir para as manifestações graves da dengue, a resposta imune celular (Kurane *et al.*, 1991; Azeredo *et al.*, 2001; Mongkolsapaya *et al.*, 2003) e a resposta humoral (Halstead e O'rourke, 1977; Simmons *et al.*, 2007), apresentam-se como algumas das mais estudadas. Neste aspecto, a literatura sugere que os mecanismos imunológicos da resposta adaptativa desempenhariam um papel vital no desenvolvimento da FHD/SCD (Kurane *et al.*, 1991; Rothman e Ennis, 1999). Uma das condições que suportam esta hipótese é o fato de que os sinais e sintomas mais graves na dengue são observados, em geral, após a redução da carga viral (Rothman e Ennis, 1999) (Figura 1.1). Sendo assim, o conhecimento da resposta imune adaptativa ao DV torna-se importante para o entendimento da imunopatogenia.

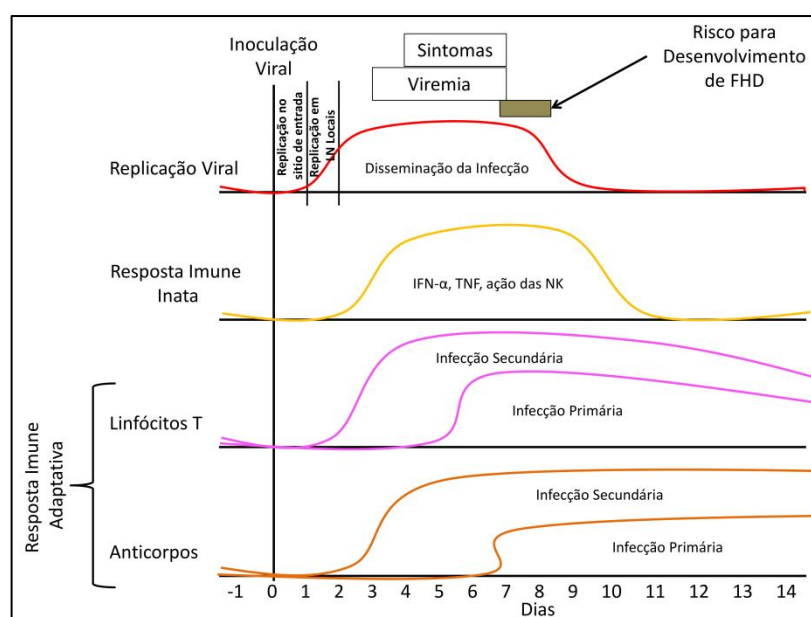


Figura 1.1 – Cinética de infecção pelo DV e da resposta do hospedeiro. Representação gráfica da relação temporal entre a viremia e os sinais clínicos observados na infecção e a resposta imunológica em pacientes infectados pelo DV. Figura adaptada do trabalho de (Rothman A. L. 2005).

Uma vez inoculado no homem através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* (Clark *et al.*, 1986), o DV tem como alvo primário as células de Langerhans (LCs) e as células dendríticas dermais (DCs) (Navarro-Sanchez *et al.*, 2003). As DCs são as mais eficientes células apresentadoras de antígenos (APC) sendo essenciais na captura, processamento e posterior transporte de antígenos aos linfonodos (Kelsall *et al.*, 2002). Uma vez nos órgãos linfóides, as DCs ativadas pela infecção pelos DV apresentam às células T CD8⁺, via HLA classe I, os antígenos virais, induzindo assim estes linfócitos à ativação e proliferação (Dejnirattisai *et al.*, 2008). Adicionalmente, outro mecanismo de ativação celular pode ocorrer quando DCs que fagocitaram corpos apoptóticos contendo proteínas virais provenientes de células infectadas, apresentam peptídeos virais via HLA classe II às células T CD4⁺, levando também estes linfócitos à ativação e proliferação (Kutubuddin *et al.*, 1991; Dejnirattisai *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que peptídeos de patógenos virais como do vírus da Encefalite Japonesa (JEV), outro importante *flavivirus*, provenientes de fagocitose podem ser apresentados via HLA classe I a linfócitos T CD8⁺, processo que é chamado de apresentação cruzada (do inglês “cross-presentation”) (Aleyas *et al.*, 2012). Além disso, as DCs e os linfócitos T CD4⁺ efetores auxiliam na ativação dos linfócitos B CD19⁺, produzindo citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-6, e IL-12, induzindo a ativação, maturação e proliferação dos linfócitos B CD19⁺ (Ho *et al.*, 2001; Ubol e Halstead, 2010). Após esta ativação, anticorpos produzidos pelas células B CD19⁺ são secretados para a corrente sanguínea. Já os linfócitos T ativados, migram até o foco de infecção e agem sobre o DV e sobre as células infectadas, determinando assim a resposta adaptativa específica contra o patógeno (Rizvi *et al.*, 1991; Simmons *et al.*, 2005; Appanna *et al.*, 2007; Weiskopf *et al.*, 2013). Esta resposta pode resultar na eliminação do DV ou, em determinadas situações, pode levar ao agravamento do quadro.

Alguns autores sugerem que uma resposta imune adaptativa ineficaz pode ocorrer em casos de infecção secundária por DV heterólogo (ou seja, infecção secundária por sorotipo distinto da infecção primária), contribuindo para o surgimento de casos graves de dengue (Halstead e O'rourke, 1977; Azeredo *et al.*, 2001; Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Contudo, já foi relatado que infecções

secundárias heterólogas podem não acarretar em manifestações graves de dengue (Gibbons *et al.*, 2007). Além disso, quadros de dengue com complicações e óbitos são também observados em infecções primárias (Barnes e Rosen, 1974; Martinez *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 2012). Estes resultados sugerem que a ocorrência da FHD/SCD pode estar vinculada com alterações na resposta imunológica adaptativa ao DV, independentemente do número ou tipo (heteróloga ou autóloga) das exposições prévias aos vírus. Atualmente, duas teorias são as mais estudadas na resposta imune adaptativa ao DV: a resposta de potencialização dependente de anticorpos (ADE, do inglês “antibody-dependent enhancement”), (Halstead e O’rourke, 1977; Malavige *et al.*, 2004) que ocorre pela ligação subneutralizante de anticorpos ao DV; e a chamada tempestade de citocinas induzida pelo fenômeno de pecado antigênico original que é relacionada com a resposta de baixa avides de linfócitos T CD4⁺ (Azeredo *et al.*, 2001) e linfócitos T CD8⁺ (Kurane *et al.*, 1991; Azeredo *et al.*, 2001; Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Deste modo, os linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) bem como, os linfócitos B participam de forma relevante na patogenia da dengue. No entanto, até o momento, pouco se sabe sobre a interação direta entre o DV e essas células.

1.4.1 Resposta de linfócitos B CD19⁺ – ADE

Os linfócitos B (CD19⁺) são responsáveis pela produção de anticorpos contra a proteína E do envelope viral (Van *et al.*, 1960). Com a produção em níveis adequados de anticorpos que possuam uma alta afinidade às proteínas virais, pode ocorrer à neutralização da partícula viral (Van *et al.*, 1960). A ligação neutralizante acontece quando estes anticorpos são direcionados à epítomos presentes no domínio II da proteína E do envelope viral, onde se encontra o peptídeo de fusão vírus-célula (Seligman, 2008). Com isso, a partícula viral perde a condição de entrada na célula alvo. Já os anticorpos anti-dengue que não são direcionados ao peptídeo de fusão ligam-se ao DV em condições não-neutralizantes (Halstead *et al.*, 1980). Adicionalmente, anticorpos anti-dengue direcionado ao peptídeo de fusão, porém com baixa avides ou em concentrações sub-ótimas, podem ligar-se a partícula viral em condições sub-neutralizantes (Halstead e O’rourke, 1977).

Em ambas as situações, além de não impedir a ligação célula-vírus, estes anticorpos subneutralizantes ou não-neutralizantes podem levar ao fenômeno de ADE (Halstead e O’rourke, 1977; Halstead, 1988). Neste caso, os anticorpos ligados

na superfície viral podem ser reconhecidos através de receptores de região Fc γ na superfície celular (Halstead *et al.*, 1980). Esta ligação, especialmente em células mononucleares, induz à fagocitose do vírus, levando ao aumento do número de células infectadas e conseqüentemente ao aumento na viremia (Halstead *et al.*, 1980). O aumento de viremia poderia contribuir para o desenvolvimento de sintomas clínicos observados nos quadros mais graves na dengue.

A produção de anticorpos de baixa avidéz sub-neutralizantes parece estar relacionada com a ocorrência de infecções subseqüentes com sorotipos heterólogos do DV (Halstead e O'rouke, 1977). Após a primeira infecção, células B CD19⁺ de memória são formadas, sendo que em uma segunda infecção, caso esta ocorra por um DV heterólogo, estas células de memória responderão de forma mais rápida que as células “naïve” específicas para o novo sorotipo viral (Halstead e O'rouke, 1977). Durante esta resposta ocorreria à produção de anticorpos que não seriam capazes de neutralizar as partículas virais circulantes, levando desta forma à condição de exacerbação da infecção por ADE (Halstead e O'rouke, 1977) (Figura 1.2). Recentemente, foi demonstrado que crianças com níveis detectáveis de anticorpos contra o JEV, teriam uma maior tendência ao desenvolvimento de dengue com complicações, corroborando com a teoria do ADE (Anderson *et al.*, 2011).

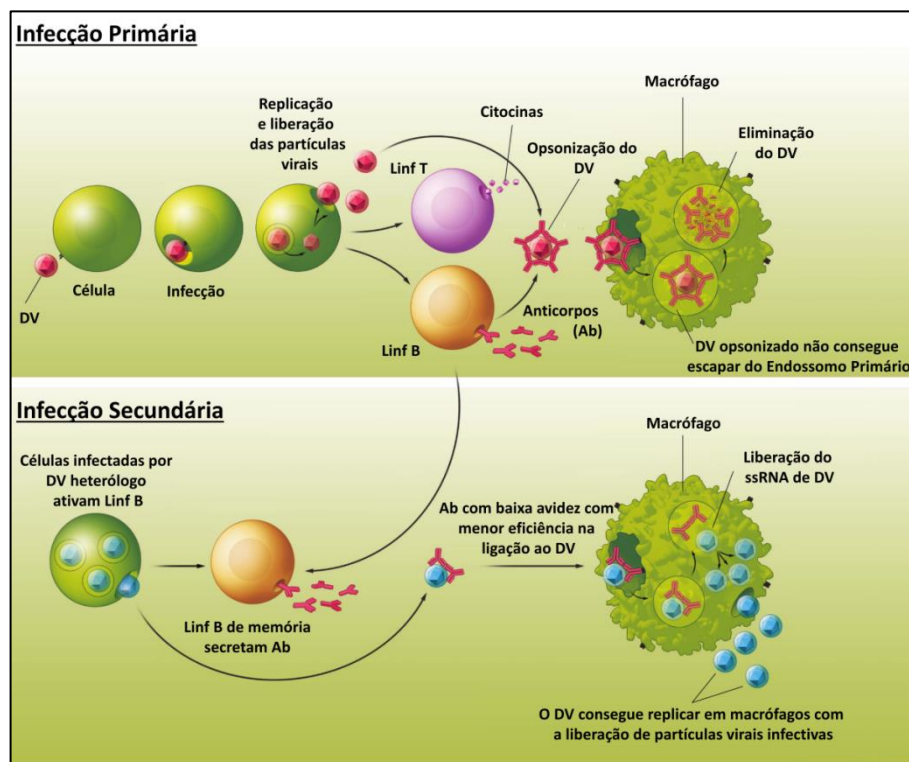


Figura 1.2 – Fenômeno de Potencialização Dependente de Anticorpos – ADE. Representação gráfica da teoria do ADE em resposta às infecções por DV heterólogo. Figura adaptada de (Mole, 2013).

Portanto, o fenômeno de ADE ou a neutralização viral sugerem que os linfócitos B CD19⁺ possuem um papel chave na imunopatologia da dengue, através da produção de imunoglobulinas. Neste sentido, já foi descrita a modulação da produção de imunoglobulinas (Ito *et al.*, 2011), a regulação da morte celular (Florins *et al.*, 2012) e a ação mutagênica (Tucci *et al.*, 2013) em linfócitos B CD19⁺ durante infecções virais por Epstein-Barr, HTLV-1 e HBV, respectivamente. Porém, esta modulação não é conhecida no caso de infecções destas células pelos DV. Além disso, há controvérsias na literatura quanto a susceptibilidade dos linfócitos B CD19⁺ a infecção pelos DV. King e colaboradores (1999) demonstraram que as células B CD19⁺ eram as principais células mononucleares circulantes infectadas por cepas de DV1 e DV2. Para tanto, culturas de células B CD19⁺, monócitos, células NK e células T foram obtidas de pacientes com FD, sendo possível realizar o isolamento viral apenas das culturas de células B CD19⁺, comprovando assim sua infecção (King *et al.*, 1999). Contudo, em trabalho mais recente, (Blackley *et al.*, 2007) não foi encontrado RNA viral após inoculação *in vitro* com a cepa DV2 16681 de culturas de linfócitos T e B provenientes do baço de voluntários saudáveis. Adicionalmente, em trabalho posterior do mesmo grupo, (Kou *et al.*, 2008) foram avaliadas por citometria de fluxo as PBMC de doadores saudáveis infectadas *in vitro* pela cepa DV2 16681, sendo demonstrada a susceptibilidade de monócitos, mas não de linfócitos T ou B.

1.4.2 Resposta de linfócitos T CD8⁺ – Pecado Antigênico Original

Na resposta imune celular ao DV, os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) são um dos responsáveis pela lise, via granzimas e perforinas, de células infectadas. Uma vez nos órgãos linfóides, células APC que tenham sido infectadas pelo DV, poderão apresentar estes antígenos aos linfócitos T CD8⁺ “naïves” específicos, induzindo assim a ativação, proliferação e migração destas células para o foco da infecção (Kutubuddin *et al.*, 1991). Os linfócitos T CD8⁺ efetores reconhecem células infectadas pelos DV, através da apresentação dos antígenos virais ligados ao HLA de classe I. O devido reconhecimento das células infectadas ocorre com a interação do complexo HLA-peptídeo, presente na superfície destas células, com o complexo do receptor de células T – CD3 (TCR-CD3) presente nos linfócitos efetores (Kurane

et al., 1984; Pang *et al.*, 1988; Azeredo *et al.*, 2006). Além deste reconhecimento, para a correta ação dos linfócitos T CD8⁺ efetoras, faz-se necessária a ligação de moléculas de adesão como a do antígeno associado à função de linfócitos 1 (LFA-1) (no linfócito) às moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (na célula infectada) (Kurane *et al.*, 1984; Pang *et al.*, 1988; Azeredo *et al.*, 2006). O completo reconhecimento das células infectadas pelos linfócitos induz à ativação de uma cascata de modulação que culmina no processo de degranulação dos linfócitos efetores, levando a liberação dos mediadores granzima e perforina ligados a serglycina (Kurane *et al.*, 1984; Pang *et al.*, 1988; Azeredo *et al.*, 2006). A proteína citolítica perforina, uma vez ligada à superfície da célula infectada, permite a entrada da enzima granzima nesta célula. As granzimas catalisam a clivagem de proteínas pro-apoptóticas como a agonista de interação ao domínio BH3 de morte celular (BID) e a pro-caspases 3. A clivagem da proteína BID induz a liberação do citocromo C presente em mitocôndrias, o que inicia mecanismos intrínsecos de apoptose celular (Kurane *et al.*, 1984; Pang *et al.*, 1988; Azeredo *et al.*, 2006). Já a caspase 3, ativada pela clivagem da pro-caspase 3, pode induzir à ativação da sintetase de carbamoil-fosfato 2 aspartato transcarbamilase dihidroorotase (CAD) (Kurane *et al.*, 1984; Pang *et al.*, 1988; Azeredo *et al.*, 2006). Neste caso, a proteína CAD migra para o núcleo da célula infectada e inicia a degradação do DNA. Além da degranulação, os linfócitos T CD8⁺ efetores produzem citocinas pro-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α reforçando assim o caráter inflamatório local. A presença do TNF- α em níveis controlados pode induzir a morte de células endoteliais infectadas, auxiliando assim na diminuição da infecção. Já o IFN- γ teria papel de induzir a expressão do HLA classe I nas células infectadas, o que pode auxiliar na apresentação dos antígenos virais aos linfócitos T CD8⁺ efetores (Kurane *et al.*, 1991; Cardier *et al.*, 2005).

A regulação desta resposta inflamatória é influenciada pela redução no número de células infectadas. Com a redução no sinal de apresentação de antígenos virais ocorre a diminuição da ativação de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ efetores. Uma vez cessado o estímulo, com a resolução da infecção, a maioria das células entram em apoptose, permanecendo ainda parte das células T CD8⁺ efetoras, as quais farão parte do grupo de células de memória contra o DV (Sun *et al.*, 2011). Com isso, células T CD8⁺ de memória permanecem inativas até o momento de uma segunda exposição ao DV. Neste momento, estas seriam as primeiras células citotóxicas adaptativas a responderem aos antígenos virais (Azeredo *et al.*, 2001;

Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Mongkolsapaya e colaboradores em 2003 propuseram que uma resposta adaptativa cruzada de células T CD8⁺ de memória de baixa avides contra DV heterólogos, poderia estar envolvida na patogenia das formas graves da dengue (Mongkolsapaya *et al.*, 2003) (Figura 1.3).

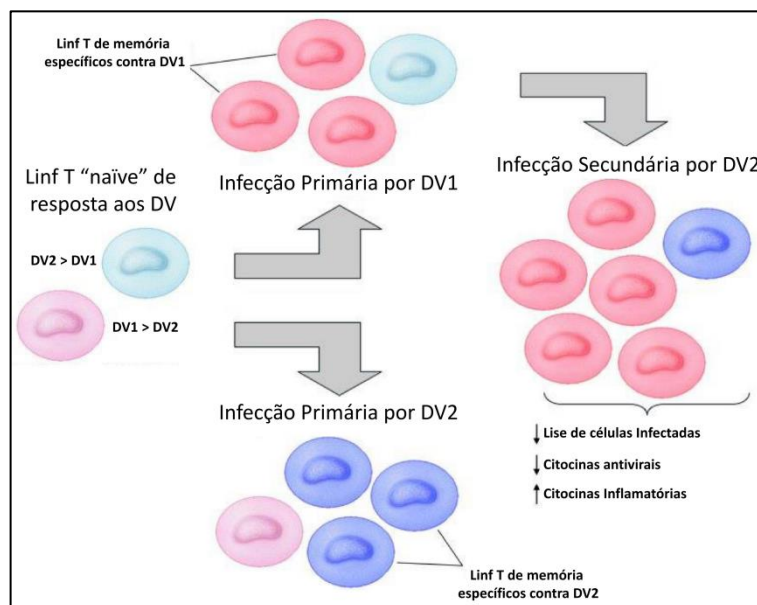


Figura 1.3 – Fenômeno do Pecado Antigênico Original. Representação gráfica da teoria do Pecado Antigênico Original (do inglês, "Original Antigenic Sin") em resposta às infecções por DV heterólogos. Figura adaptada do trabalho de (Rothman, 2004).

A ligação cruzada de baixa avides com antígenos do DV heterólogos apresentados por células infectadas é capaz de ativar as células T CD8⁺ de memória. Com esta ativação, seria induzida a produção de elevados níveis de citocinas, porém a função de degranulação dos linfócitos T CD8⁺ não seria induzida corretamente caracterizando-se, portanto, como uma resposta ineficiente na lise de células infectadas (Azeredo *et al.*, 2001; Mongkolsapaya *et al.*, 2003; Mongkolsapaya *et al.*, 2006) (Figura 1.3). Os mecanismos pelos quais a regulação destas células não ocorre corretamente ainda não foram bem esclarecidos, porém os níveis de moléculas inibitórias da família B7-CD28, como a de morte celular programada 1 (PD-1) nos linfócitos T e a PD-L1/2 nas APC, podem estar envolvidos (Fuse *et al.*, 2009). Adicionalmente, a apresentação de antígenos leva a fosforilação dos resíduos da proteína CD3ξ, disparando uma cascata de ativação, culminando na expressão diferencial de genes como o CD69 e CD25 (cadeia α do receptor de IL-2) (Liu *et al.*, 2000). Já foi demonstrado que em ligações de baixa avides este processo de fosforilação pode não ser eficaz, sugerindo assim um mecanismo para a degranulação celular ineficiente (Hofmann *et al.*, 2004).

Uma baixa eficiência de eliminação de células infectadas, ocasionada pela degranulação ineficiente, acarreta na manutenção da apresentação de antígenos virais para células T CD8⁺ de memória, elevando assim a produção de citocinas pela ativação celular (Avirutnan *et al.*, 2006). O aumento nos níveis de citocinas pode correlacionar-se com os casos graves de dengue, como a citocina TNF- α que está aumentada no soro de pacientes em alguns casos de FHD, e da citocina IL-10, que foi vinculada ao decaimento do número de plaquetas circulantes (Azeredo *et al.*, 2001). Adicionalmente, com a ligação de baixa avidéz, é possível ainda que as células T CD8⁺ entrem em processo de apoptose, dificultando ainda mais a resposta efetiva e a eliminação do patógeno (Azeredo *et al.*, 2001; Mongkolsapaya *et al.*, 2003; Avirutnan *et al.*, 2006; Mongkolsapaya *et al.*, 2006; Dejnirattisai *et al.*, 2008). As células endoteliais podem também ser afetadas pelos elevados níveis de citocinas inflamatórias secretadas pelos linfócitos T CD8⁺ ativados pela ligação cruzada (Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Os mediadores inflamatórios induziriam a apoptose das células endoteliais o que pode culminar na elevação da permeabilidade vascular, no extravasamento de plasma e na hemoconcentração, que são sinais evidentes em casos de dengue com complicações (FHD/SCD) (Mongkolsapaya *et al.*, 2003; Avirutnan *et al.*, 2006; W.H.O., 2009; W.H.O., 2012a).

Desta forma, o processo inflamatório induzido pela resposta das células T CD8⁺ tem papel central na patogenia da dengue. Porém, da mesma forma que em células B CD19⁺, não é conhecido o efeito da infecção dos linfócitos T CD8⁺ pelo DV sobre a resposta inflamatória, sendo que não existe consenso quanto à susceptibilidade dos linfócitos T CD8⁺ para infecção por estes vírus. Em estudo de Kurane e colaboradores em 1990 foi demonstrado infecções *in vitro* de diferentes linhagens (leucêmicas ou de linfomas) de monócitos, linfócitos B CD19⁺ e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ pelo DV2. Destas culturas, todas as cinco linhagens de células T CD4⁺ ou CD8⁺ testadas apresentaram positividade para a presença do DV, através da marcação intracelular com anticorpo específico e titulação do sobrenadante (Kurane *et al.*, 1990). Confirmando o dado anterior, o mesmo grupo demonstrou pela técnica de imunofluorescência intracelular que a infecção de diferentes linhagens (não leucêmicas ou de linfomas) de linfócitos T CD4⁺ (JK44 e JK49), e linfócitos T CD8⁺ (CB2.8 e CB6.17) pela mesma cepa de DV2, em 20-60 horas após a infecção. A progênie viral foi quantificada por imunodeteção das unidades formadoras de foco em C6/36 contidas no sobrenadante das culturas após 40 horas de infecção (Mentor e Kurane, 1997). Porém, como citado no item 1.4.1, trabalhos mais recentes afirmam

que linfócitos T não são infectados pelos DV (Blackley *et al.*, 2007; Kou *et al.*, 2008).

1.4.3 Resposta de linfócitos T CD4⁺

Outra população celular que pode contribuir para a imunopatologia da dengue são os linfócitos T auxiliares (CD4⁺). As APC são capazes de fagocitar corpos apoptóticos de células que foram infectadas pelos DV (Kurane *et al.*, 1991). A fagocitose destes antígenos leva a ativação das APCs, que por sua vez podem induzir a ativação de células T CD4⁺ “naïve”, através da apresentação de antígenos virais pelo HLA classe II ligado aos peptídeos do patógeno (Dejnirattisai *et al.*, 2008). Com a ativação e polarização, os linfócitos T CD4⁺ efetores migram ao foco de infecção. A ação das células T CD4⁺ efectoras é auxiliar a resposta de linfócitos T CD8⁺ e B CD19⁺, modulando esta resposta através da produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias o que, na maioria dos casos, poderá culminar com a resolução da infecção. Com a resolução, a maioria das células T CD4⁺ efectoras entrará em apoptose e será eliminada, restando uma parcela de células de memória, que responderão de forma rápida no caso de uma segunda infecção (Kurane *et al.*, 1991; Dejnirattisai *et al.*, 2008; Chase *et al.*, 2011).

Nesta segunda infecção, à ligação de peptídeos de DV com alta avidéz a linfócitos T CD4⁺ de memória podem induzir a maior produção de IFN- γ quando comparada com a produção de TNF- α , o que resultaria em uma ação antiviral efetiva (Mangada e Rothman, 2005). Porém, caso esta segunda infecção seja por vírus heterólogo, linfócitos T CD4⁺ de memória de baixa avidéz podem produzir o fenômeno conhecido como tempestade de citocinas (Monath *et al.*, 1986; Azeredo *et al.*, 2001; Nielsen, 2009). Nesta teoria, a presença de ligantes de baixa avidéz levaria a exacerbação da produção de TNF- α em detrimento da produção de IFN- γ (Azeredo *et al.*, 2001; Mangada e Rothman, 2005). Adicionalmente, foi demonstrado que células T CD4⁺ provenientes de indivíduos com relato de infecção por DV, ao serem estimuladas por cepa viral homóloga, produziram IFN- γ e IL-2, porém, quando o estímulo de baixa avidéz foi realizado com cepa viral heteróloga, foram detectados apenas níveis de TNF- α (Imrie *et al.*, 2007). Os elevados níveis de produção de citocinas como o TNF- α podem acarretar na indução de apoptose, o que por sua vez estaria correlacionado com a perda da permeabilidade vascular observada na FHD/SCD (Mongkolsapaya *et al.*, 2006).

É interessante observar que a indução da ativação de linfócitos T CD4⁺ de memória por ligação cruzada de baixa avididade pode ocorrer até mesmo por outros vírus que não o DV (Moran *et al.*, 2008). Já foi relatado que clones de linfócitos T CD4⁺ gerados em pacientes durante infecções agudas pelo DV, mostraram-se reativos pela ligação cruzada com epítomos heterólogos de outros *flavivirus* (vírus do Oeste do Nilo, Encefalite Japonesa e Febre Amarela), resultando na produção exacerbada de citocinas (Moran *et al.*, 2008). Portanto, de modo geral a ligação cruzada de baixa avididade induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (Azeredo *et al.*, 2001).

Adicionalmente, a polarização de linfócitos T CD4⁺ efetores ativados pode também influenciar na imunopatogenia da dengue. Os perfis de polarização são definidos de acordo com o conteúdo e concentração das citocinas presentes no microambiente, produzidas prioritariamente pelas APC, no momento da apresentação do antígeno, definindo assim o modo de resposta efetora que estas células irão apresentar. No trabalho de Chaturvedi e colaboradores em 2001 foi demonstrado que pacientes que direcionam a resposta de células T CD4⁺ efectoras com padrão Th1 no início da infecção, induzindo também à ativação de células T CD8⁺ através da produção de IFN- γ , e sustentam este padrão ao longo do processo infeccioso, teriam uma menor tendência ao desenvolvimento de quadros graves da doença (Chaturvedi, 1999; Chaturvedi *et al.*, 1999). Por outro lado, os pacientes que desenvolvem uma resposta de padrão Th2, ou que mudam de Th1 para Th2 ao longo da infecção, estimulando assim principalmente células B CD19⁺ pela produção de IL-4 e IL-2, apresentariam maior risco de evoluírem para as formas graves (FHD/SCD) (Chaturvedi *et al.*, 1999). Além disso, o perfil Th17 também pode ser vinculado aos casos de dengue com complicações. No trabalho de Jain e colaboradores em 2013, foi demonstrado no soro de pacientes com FD um aumento significativo nos níveis de IL-17 (marcador do perfil Th17), quando comparados com o controle não infectado, sendo que esta produção foi ainda maior em pacientes com FHD (Jain *et al.*, 2013). Adicionalmente, as células de perfil Th17 podem secretar a citocina TNF- α , a qual já foi implicada nos casos de dengue com complicações pelo seu papel na lise de células endoteliais (Jovanovic *et al.*, 1998).

Porém, apesar das várias hipóteses de resposta dos linfócitos T CD4⁺ aos DV, não se conhece a capacidade dos DV em infectar estas células, como citado anteriormente nos itens 1.4.1 e 1.4.2 (Kurane *et al.*, 1986; Mentor e Kurane, 1997; Blackley *et al.*, 2007; Kou *et al.*, 2008). A importância de se determinar a

suscetibilidade destas células a infecção pelo DV é sugerida por trabalhos com outras viroses, como o Epstein-Barr (Kanegane *et al.*, 1998) ou o HIV (Gutierrez-Sanmartin *et al.*, 2008), que demonstram que estas infecções podem modificar a resposta funcional dos linfócitos T CD4⁺ efetores, acarretando em uma perda da eficiência no combate ao patógeno.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é determinar a susceptibilidade e a resposta funcional *in vitro* de linfócitos T e B humanos frente à infecção por cepas dos quatro sorotipos do DV.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar a susceptibilidade *in vitro* de linfócitos T e B humanos de doadores saudáveis à infecção com cepas dos quatro sorotipos do DV;
- Caracterizar o possível receptor para a ligação do DV aos linfócitos T e B humanos;
- Determinar os níveis de citocinas de perfil Th1/Th2/Th17 no sobrenadante de cultura de linfócitos T e B infectados pelo DV;
- Analisar a ativação de linfócitos T e B infectados pelo DV, assim como determinar o efeito da ativação celular para a infecção pelo DV;
- Caracterizar os níveis de morte celular nas culturas de linfócitos T e B humanos após infecção pelo DV;
- Examinar a capacidade de proliferação celular dos linfócitos T e B humanos infectados pelo DV, induzida por ensaio misto de leucócitos alogênico com células dendríticas;
- Determinar a capacidade de expansão clonal dos linfócitos T e B humanos infectados pelo DV, após estimulação por antígenos virais heterólogos;
- Analisar a resposta de degranulação celular e determinar os níveis de granzima e perforina no sobrenadante das culturas de linfócitos T humanos infectados pelo DV;

- Caracterizar a infecção e a produção de granzima pelas culturas enriquecidas de linfócitos T CD8⁺ “naïve” e memória, após a infecção pelo DV;
- Analisar a polarização de células T CD4⁺ para os perfis Th1/Th2/Th17 após infecção pelo DV;
- Examinar a presença da imunoglobulina da classe M contra o DV em culturas de células enriquecidas com linfócitos B CD19⁺ após a infecção pelo DV;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das PBMCs

Foram utilizadas células primárias coletadas de doadores saudáveis por punção venosa de superfície (CEP – 514/09/Fiocruz, Anexo III), utilizando-se sistema de vácuo e tubos com heparina sódica (Vacuplast, cat - 12-2012). Uma lista completa das culturas realizadas pode ser obtida no Anexo II deste trabalho. Do sangue total foram obtidas inicialmente as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), por técnica de separação por densidade. Para tanto, o sangue total foi diluído nas proporções de 1:1 até 1:4 v/v com solução de 0,9% de Cloreto de Sódio (Anexo I) estéril. Esta mistura foi então colocada sobre a solução de separação “Lymphocyte Separation Medium” (LONZA, cat - 17829E) em uma proporção de 3:1 v/v, em tubos cônicos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 750 x g por 20 min à T.A., com freio e aceleração mínimas. Após a centrifugação, foram coletadas as células presentes na nuvem de separação entre o plasma e o separador, obtendo-se assim as PBMC. Estas células foram então lavadas em solução P.B.E. (Anexo I), e centrifugando-se a 350 x g por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas com 5 mL de Solução de Lise (Anexo I), sendo incubadas em gelo por 5 min. Após a lise das hemácias as células foram novamente lavadas com 30 mL de P.B.E. e os tubos foram novamente centrifugados, agora a 160 x g por 15 min à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas com 35 mL de P.B.E. sendo os tubos centrifugados a 300 x g por 10 min à 4°C. Novamente o sobrenadante foi desprezado e a concentração de células foi recuperada de diferentes maneiras, de acordo com o procedimento experimental subsequente, PBMC, linfócitos totais ou “cell-sorting”.

3.1.1 Culturas de PBMC

As PBMC foram recuperadas com meio RPMI completo sem SFB (Anexo I; Lonza, cat - 12702Q), em diferentes volumes, respeitando a concentração final de $5,0 \times 10^6$ PBMC/mL. Esta suspensão foi utilizada de acordo com os protocolos abaixo citados.

3.1.2 Linfócitos totais

Para este trabalho, foram chamadas de culturas de linfócitos totais as populações celulares componentes do PBMC e que sejam negativas para o marcador de superfície CD14, ou que não sejam capazes de aderir ao plástico. Foram utilizados dois diferentes protocolos para a obtenção dos linfócitos totais: “immunosorting” magnético com “beads” (Miltenyi Biotec – cat 130-090-879) recobertas por anticorpos contra a proteína de superfície CD14; ou técnica de separação por aderência ao plástico. Para a separação por “beads” as PBMC foram recuperadas em 5 mL de P.B.E., contendo 120 µL de “beads”, e incubadas em gelo por 20 min. Após a incubação, o volume foi completado para 35 mL com P.B.E. e os tubos foram centrifugados a 300 x g por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas em 5 mL de P.B.E.. Esta suspensão celular foi então adicionada à Coluna de Separação (Miltenyi Biotec – cat 130-042-401) já devidamente conectada ao suporte magnético e com cargas elétricas equilibradas, aguardando-se a eluição por gravidade. Após a primeira eluição foi adicionado a coluna 5 mL de P.B.E., permitindo-se novamente a eluição por gravidade. A parcela negativa da primeira eluição foi considerada uma suspensão enriquecida em linfócitos totais, designada como CD14⁻. Para a obtenção das células CD14⁺, as quais foram consideradas como uma população enriquecida em monócitos, a Coluna de Separação foi retirada do magnético e a suspensão de células foi eluída com 5 mL de P.B.E.. A ambas as suspensões celulares foi adicionado volume de P.B.E. suficiente para 35 mL e os tubos foram centrifugados a 300 x g por 10 min à 4°C. As células foram recuperadas com meio RPMI completo sem SFB, em diferentes volumes, respeitando a concentração de 5,0 x 10⁶ cél/mL.

Já para a técnica de separação por aderência ao plástico, as PBMC foram recuperadas em 10 mL de meio de cultura RPMI completo sem SFB. Estas foram contadas e foi adicionado meio de cultivo suficiente para que as células ficassem em uma concentração final de 1,0 x 10⁷ PBMC/mL. A suspensão de células foi transferida para uma garrafa de cultivo de 300 cm², e incubada por 1h30min a 37°C sob 5% CO₂. Após esta incubação, o meio foi transferido para tubos cônicos, e esta suspensão celular foi considerada enriquecida em linfócitos totais. Já a garrafa foi lavada duas vezes com PBS resfriado, sendo agitada entre as lavagens. O PBS restante das lavagens foi desprezado. A estas garrafas foi adicionado RPMI completo e estas culturas foram consideradas enriquecidas em monócitos.

3.1.3 Populações enriquecidas por “cell-sorting”

Para a realização dos procedimentos de separação celular por “cell-sorting”, as PBMC foram recuperadas com 5 mL de tampão de bloqueio - TB (Anexo I) e incubadas por 20 min em T.A.. Após a incubação, foi adicionado à suspensão celular anticorpos que reconhecem proteínas na superfície das células. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD3 PE, anti-CD14 FITC, anti-CD8 PercP, anti-CD19 PE-Cy7, anti-CD4 APC (BD, cat – 555340, 557700, 347314, 557835 e 555349), bem como, seus respectivos controles isotípicos. Esta suspensão celular foi então incubada por 20min a 37°C. Com o término da incubação, os tubos foram centrifugados a 1000 x g por 5 min a T.A., o sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas com 15 mL de PBS. Esta suspensão celular foi então utilizada para o procedimento de “cell-sorting”, realizada no equipamento FACSAria II (Becton and Dickinson) utilizando-se durante os procedimentos o “nozzle” de 85 µm com pressão de 45 psi sendo as demais configurações ajustadas segundo recomendações do fabricante. As estratégias de “gate” foram demonstradas em cada um dos experimentos onde se utilizou este tipo de procedimento. De modo geral, foi obtida uma pureza acima de 91% para todos os experimentos de “cell-sorting”, sendo que todas as culturas foram consideradas enriquecidas para as populações alvo. As células foram recuperadas com meio RPMI completo sem SFB, em diferentes volumes, respeitando a concentração de $5,0 \times 10^6$ cél/mL. Estas suspensões foram utilizadas de acordo com os protocolos abaixo citados.

3.2 Estoques virais e Infecções

Para os experimentos de infecção com o vírus da dengue foram utilizadas duas cepas que são modelos laboratoriais do DV com elevado número de passagens em cultura de células, a DENV-1/BR/90 sorotipo 1 primeiramente descrito por (Despres *et al.*, 1993) e a DENV-4/TVP360 do sorotipo 4 gentilmente cedido ao nosso laboratório pelo Dr. Ricardo Galler da Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil. Adicionalmente, foram utilizadas duas outras cepas que, diferente das anteriores, foram isoladas e mantidas por 3 e 4 passagens em nosso laboratório. A cepa do sorotipo 2 é a DENV-2/ICC265 que foi isolada de um caso de febre da dengue ocorrido no estado do Paraná, Brasil, no ano de 2009 e a cepa do sorotipo 3, a BR

DEN3/98-04 que primeiramente foi descrita por (Nogueira *et al.*, 2008), foi isolada de um caso FD, na cidade Rio Branco estado do Acre, Brasil, no ano 2004. Neste trabalho iremos nos referir às cepas de forma resumida como DV1 BR90, DV2 265, DV3 98 e DV4 360.

Todos os estoques de suspensões virais foram obtidos de sobrenadante clarificado por centrifugação a 1500 x g por 5 min, de culturas de células de estágio larval de mosquito *Aedes albopictus* [C6/36, (Igarashi, 1978)], infectados com multiplicidade de infecção (MOI) entre 0.1 e 1 das diferentes cepas de DV. As amostras de vírus foram aliqüotadas e armazenadas à -80°C. As concentrações virais contidas em cada estoque foram obtidas pela técnica de imunodeteção de foco (Gould e Clegg, 1985). Brevemente, 0,4 mL de diferentes diluições dos estoques virais foram utilizados para infectar células C6/36 por 1h30min. Após esta incubação o inóculo foi retirado e foi substituído por 0,5 mL de meio L15 2x completo (Anexo I) diluído 1:1 v/v com CMC 3% (Sigma- Aldrich, cat – C4888) e incubado em B.O.D. a 27°C. Após 7 dias de cultivo as células foram lavadas com PBS 1x (3x), fixadas com paraformaldeído 3% (Sigma, cat – P6148) por 20 min e permeabilizadas com Triton 4% (Sigma, cat – P5927) por 4 min. Posteriormente, as células foram imunomarcadas para a determinação intracelular dos DV com anticorpo monoclonal (mAb) anti-proteína E de *Flavivirus*, 4G2, por 1 hora a 37°C, seguido de lavagem com PBS 1x (3x) e marcação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina em diluição de 1:10.000 (Promega, cat – 29840902) por mais 1 hora a 37°C. Após lavagem com PBS 1x (3x), a revelação foi realizada com 200 µL/poço de tampão AP (Anexo I) contendo 1,32 µL de BCIP (Promega, cat – S381C) e 0,66 µL de NBT (Promega, cat – S380C), sendo as placas mantidas em agitador horizontal por até 30 min. O sobrenadante foi então desprezado e a placa lavada com água desmineralizada. Os focos formados foram então usados para a determinação das concentrações dos estoques virais e expressos como unidades formadoras de foco em C6/36 por mL (ffu_{C6/36}/mL). Para a obtenção do controle negativo de infecção, “Mock”, foram realizados em paralelo a imunodeteção de foco com uma suspensão de meio de culturas de C6/36 que não continha partículas virais. A ausência de unidades formadoras de foco no “Mock” foi utilizada como comprovação da negatividade para a infecção por dengue.

Para a infecção das células humanas com as cepas de DV, as células obtidas como descrito no item 3.1 foram inoculadas com os estoques virais ou “Mock” (Diagrama 3.1). Utilizou-se uma MOI de 10. Para tanto, 5,0 x 10⁵ células foram

incubadas com $5,0 \times 10^6$ ffu_{C6/36} em um volume final de 2 mL de RPMI sem SFB, por 2 horas à 37°C, homogeneizando-se as células por inversão a cada 15 min. Após este período, os tubos foram centrifugados à 5000 x g por 30 seg, o sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas com 0,5 mL de meio RPMI completo. A suspensão celular foi então incubada por 5 dias à 37°C sob 5% de CO₂, em placas de 24 poços. Após este período, as células foram recuperadas e diferencialmente tratadas de acordo com cada experimento.

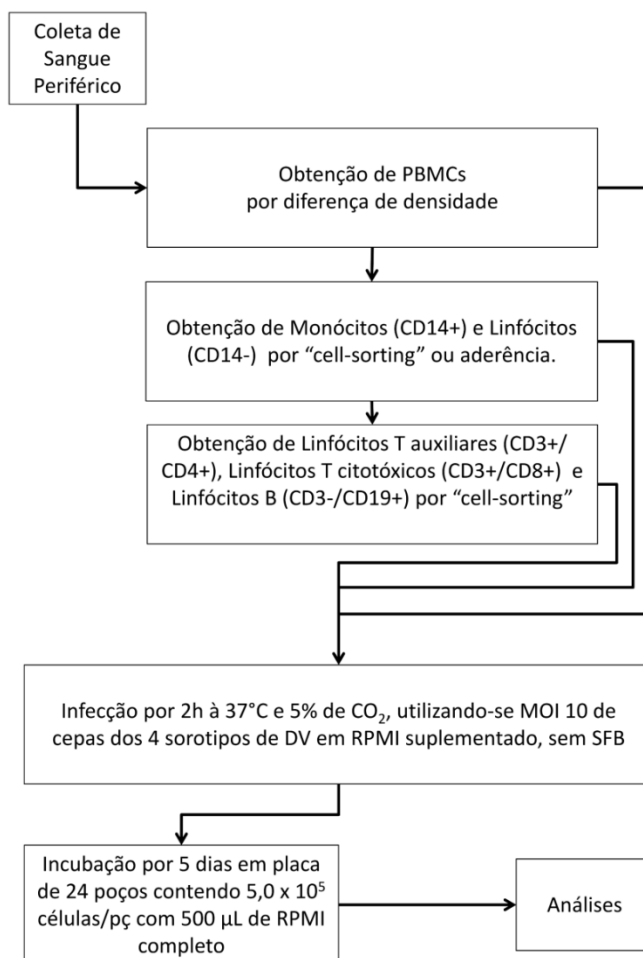


Diagrama 3.1 – Desenho experimental para a determinação da susceptibilidade de células humanas pelos DV. Representação esquemática do desenho experimental adotado para as infecções de células humanas com os quatro sorotipos de DV.

3.3 Imunofenotipagem, marcação intracelular para DV

Para marcação imunofenotípica e/ou de antígenos virais no interior das células, as mesmas foram recuperadas das placas por centrifugação a 5000 x g por 30 seg o sobrenadante das culturas foi armazenado à -80°C para análises posteriores, sendo

as células recuperadas em 100 μ L de TB (Anexo I). Para os experimentos de determinação da replicação viral, 50 μ L da suspensão celular foi novamente centrifugada como descrito acima, o sobrenadante foi desprezado, e as células foram armazenadas à -80°C para posterior análise. Já os 50 μ L restantes da suspensão celular, foram incubados por pelo menos 20 min à T.A.. Após a incubação, as suspensões foram transferidas para placa de 96 poços com fundo em U, centrifugadas a 1500 x g por 2 min. O sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas com 100 μ L de “Cytotfix/Cytoperm” (BD, cat – 554714), e incubadas por 20 min a T.A., protegido da luz. Após a incubação, foi adicionado 100 μ L de “PermWash Solution 1X” (BD, cat – 554714), a placa foi centrifugada a 1500 x g por 2 min e o sobrenadante foi desprezado. As células foram recuperadas com 100 μ L de 4G2 (10 μ g/mL) em diluição de 1:100 v/v em “PermWash”, incubadas por pelo menos 20 min a 37°C . Após a incubação, foi adicionado 100 μ L de “PermWash”, a placa foi centrifugada a 1500 x g por 2 min e o sobrenadante foi desprezado. As células foram recuperadas com 100 μ L de mAb anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, cat – 11001) em diluição de 1:100 v/v em “PermWash”, incubadas por pelo menos 20 min a 37°C . Após a incubação, foi adicionado 100 μ L de “PermWash”, a placa foi centrifugada a 1500 x g por 2 min e o sobrenadante foi desprezado. As células foram recuperadas com 50 μ L de uma mistura de anticorpos diluídos 1:25 v/v em TB, sendo: anti-CD14 PE, anti-CD8 PercP, anti-CD19 PE-Cy7, anti-CD4 APC (BD, cat – 555398, 557700, 347314, 557835 e 555349). Células controle foram marcadas com os respectivos controles isotípicos. As células foram então incubadas por pelo menos 20 min a 37°C . Após a incubação, foi adicionado 100 μ L de “PermWash”, a placa foi centrifugada a 1500 x g por 2 min e o sobrenadante foi desprezado. As células foram recuperadas com 200 μ L de PBS. Esta suspensão de células foi então analisada por citometria de fluxo em FACSCanto II (Becton and Dickinson). Todos os dados provenientes de ensaios de citometria de fluxo e “cell-sorting” realizados neste trabalho foram analisados no programa DIVA v 6.0 da Becton Dickinson e/ou FlowJo v7.1, da TreeStar Inc..

Exclusivamente para o experimento demonstrado na Figura 4.2, uma alíquota das PBMC foi retirada dos poços após a determinação da porcentagem de infecção via citometria de fluxo. Os tubos contendo estas alíquotas foram centrifugados a 1500 x g por 2 min, o sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas em 5 μ L de PBS contendo DAPI 1x. Esta solução foi adicionada a uma lâmina de

vidro para microscopia, previamente preparada com poli-L-lisina 10%, sendo incubada por 5 min à 37°C. Após esta incubação, o excesso de PBS foi retirado por pipetagem e foi adicionado sobre a lâmina de vidro uma lamínula, selando-se as bordas. Esta foi então examinada ao microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems).

3.4 Determinação da proteína NS1

O sobrenadante das culturas enriquecidas por “cell-sorting” foi analisada para a determinação da presença da proteína não-estrutural do DV NS1. Para tanto, foi utilizado o kit diagnóstico “Panbio Dengue Early ELISA” (Panbio, cat – SD01PE40). Brevemente, 100 µL de sobrenadante das culturas e controles foram adicionados aos poços da placa de reação. A placa foi então incubada por 1 hora a 37°C, sendo que posteriormente os poços foram lavados seis vezes com 350 µL de “Wash Buffer”. Foi adicionado aos poços 100 µL de complexo “antigen-MAb” e a placa foi então incubada por 1 hora a 37°C e foi posteriormente lavada seis vezes com 350 µL de “Wash Buffer”. Após este passo, 100 µL de TMB foram adicionados aos poços. A placa foi incubada por 10 min à T.A, sendo que após esta incubação, foi adicionado 100 µL de Solução de Parada. (“1M Phosphoric acid”). Com isso, a absorbância da reação pode ser determinada nos comprimentos de onda de 600 e 650 nm. Os valores de D.O. foram utilizados para o calculo do index segundo indicação do fabricante. Os valores são expressos de acordo com a linha de corte (“cutoff”) para determinar a presença ou ausência da proteína NS1 no sobrenadante das culturas.

3.5 Replicação e progênie viral

Nas culturas enriquecidas por “cell-sorting”, as células infectadas e controles que foram congeladas à -80°C, foram descongeladas e o RNA total foi extraído utilizando-se o kit “RNAesy Mini Kit” (QIAGEN, cat – 74104) de acordo com as recomendações do fabricante. Utilizando-se a técnica de PCR quantitativo (qPCR), foram analisados os níveis de RNA da proteína não-estrutural do DV NS3 assim como o da proteína “housekeeping” de eucariotos 18S. Para a realização dos qPCRs, o cDNA foi obtido utilizando-se iniciadores randômicos (4 pmol/reação) (Invitrogen, cat – 48190-011) e 1 µL da enzima transcriptase reversa (Promega, cat

– A3802) por 2h a 42°C grau. As reações de PCR foram realizadas com “SYBR Green Master Mix” (Applied Biosystem, cat – 4344463) e 4 pmol/reação de iniciadores específicos (Tabela 3.1). A ciclagem utilizada foi: 50°C por 2 min, 96°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 96°C por 15 seg., 59°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. As curvas de dissociação foram utilizadas para a verificação da especificidade relativa da reação. O gene constitutivo 18S foi utilizado para a realização da normalização e da quantificação das reações de amplificação. A modulação dos genes foi calculada pelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ adaptado do trabalho de Livak e colaboradores de 2001 (Livak e Schmittgen, 2001). Após a comprovação da relação de eficiência de cada iniciador, foi obtido o delta Ct I correspondente a variação do Ct entre o gene de interesse e o normalizar na célula infectada. Já o delta Ct II foi obtido pela variação do Ct máximo detectado na reação e o Ct do normalizar na célula “Mock”. A variação da expressão gênica foi então obtida pela potência na base dois da subtração negativa dos valores de delta Ct I pelo delta Ct II.

Tabela 3.1 – Características dos iniciadores utilizados nos ensaios de replicação. Nome dos Iniciadores, gene ID, sequências, temperatura de anelamento, tamanho do “amplicon” e concentração de cDNA utilizada nos qPCRs.

Nome dos Inic.	Gene ID	Sequencia F	Sequencia R	TM	“Amplicon size”	[] cDNA
18S	100008588	CACGGCCGGT ACAGTGAAAC	CCCGTCGGCA TGTATTAGCT	59.0°C	152bp	0.5ng/μL
NS3	-	GACATCTTTC GAAAGAGAAG	AGATACCAA CTCCAGCTAT	59.0°C	160bp	0.5ng/μL

Os sobrenadantes das culturas foram utilizados ainda para a determinação da progênie viral, após a infecção com o DV. Os ensaios foram realizados para a obtenção dos níveis de unidades formadoras de foco por mL (ffu_{C6/36}/mL) seguindo o procedimento descrito no item 3.2.

3.6 Determinação do Receptor de Entrada do DV em Linfócitos Humanos

No intuito de determinar se moléculas de heparan sulfato poderiam ser o receptor de entrada do vírus da dengue nas populações linfocitárias, suspensões virais (contendo partículas infectivas do DV) dos quatro sorotipos foram incubadas com heparina (molécula análoga do heparan sulfato). Para a realização deste ensaio, $5,0 \times 10^6$ ffu_{C6/36}/mL em 0,1 mL de volume final de RPMI completo sem SFB contendo as suspensões virais foram incubadas com concentrações de 0 (controle positivo para infecção), 20, 50, 100 ou 200 μg/mL de heparina. Esta solução foi

incubada a 37°C por 2 horas. Após este período, a suspensão foi utilizada como inóculo para a infecção de linfócitos totais, como descrito no item 3.2, e a porcentagem de infecção foi analisada conforme descrito no item 3.3.

Adicionalmente, no intuito de confirmar os resultados obtidos no ensaio de heparina, suspensões de linfócitos totais foram tratadas com a enzima heparinase, a qual retira da superfície celular resíduos de heparan sulfato. Para tanto, $5,0 \times 10^5$ linfócitos totais foram tratados com concentrações de 0 (controle positivo para infecção), 0,5, 1,0 e 5,0 U/mL de heparinase em 0,1 mL de RPMI completo à 37°C por 2 horas. Após esta incubação, estas células foram infectadas com cepas de DV como descrito no item 3.2, sendo analisadas como no item 3.3. O diagrama 3.2 apresenta os dois experimentos para determinação do heparan sulfato como possível receptor para o vírus da dengue em linfócitos humanos.

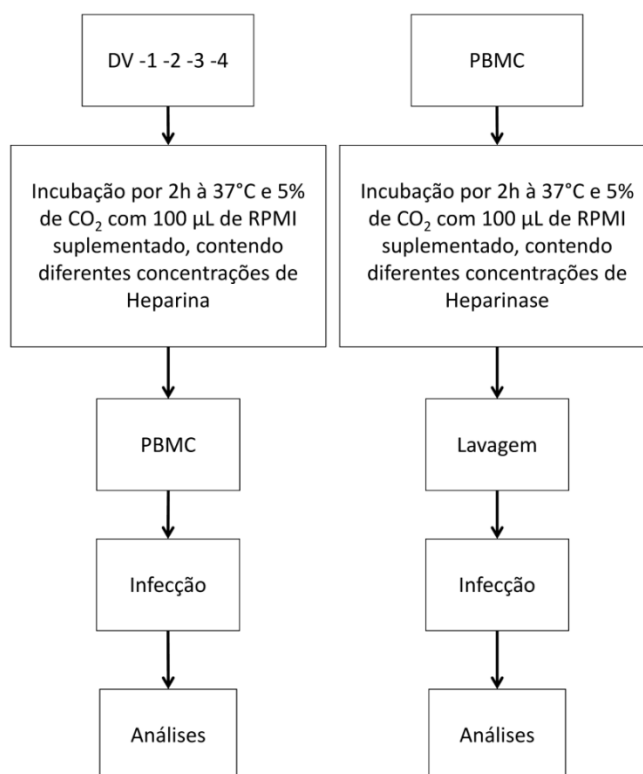


Diagrama 3.2 – Desenho experimental para a determinação dos receptores de entrada viral em populações linfocitárias. Representação esquemática do desenho experimental adotado para as análises do possível receptor de entrada nas populações linfocitárias utilizado pelo DV.

3.7 Determinação dos níveis de citocinas perfil Th1/Th2/Th17

No sobrenadante das culturas de PBMC, linfócitos totais e culturas enriquecidas para LT CD4⁺, LT CD8⁺ e LB CD19⁺, foram determinados os níveis de

citocinas de perfil Th1 (IL-10, TNF- α , IFN- γ), de perfil Th2 (IL-2, IL-4, IL-6) e de perfil Th17 (IL-17A). Para tanto foi utilizado kit “Cytometric Bead Array” (BD, cat – 560484). Brevemente, 50 μ L de sobrenadante das culturas ou dos pontos da curva de controle foram transferidos para placas de 96 poços com fundo em U. A estas foram adicionados 50 μ L de mistura de “beads” e detector, fornecidos pelo kit, incubando-se por 3 horas a T.A. protegidos da luz. Após a incubação, foi adicionado aos poços 100 μ L de “Wash Buffer” e foi realizada uma centrifugação de 1500 x g por 2 min sendo o sobrenadante descartado. As “beads” foram recuperadas com 200 μ L de “Wash Buffer” e a determinação das concentrações das citocinas foi obtida utilizando-se para tanto o citômetro de fluxo FACSCanto II da Becton Dickinson. Os dados de citometria foram analisados no programa “FCAP Array, v1.0.1, da Soft Flow Hungary Ltd.” e/ou no programa FlowJo v7.1, da TreeStar Inc., obtendo-se assim as concentrações das citocinas em pg/mL.

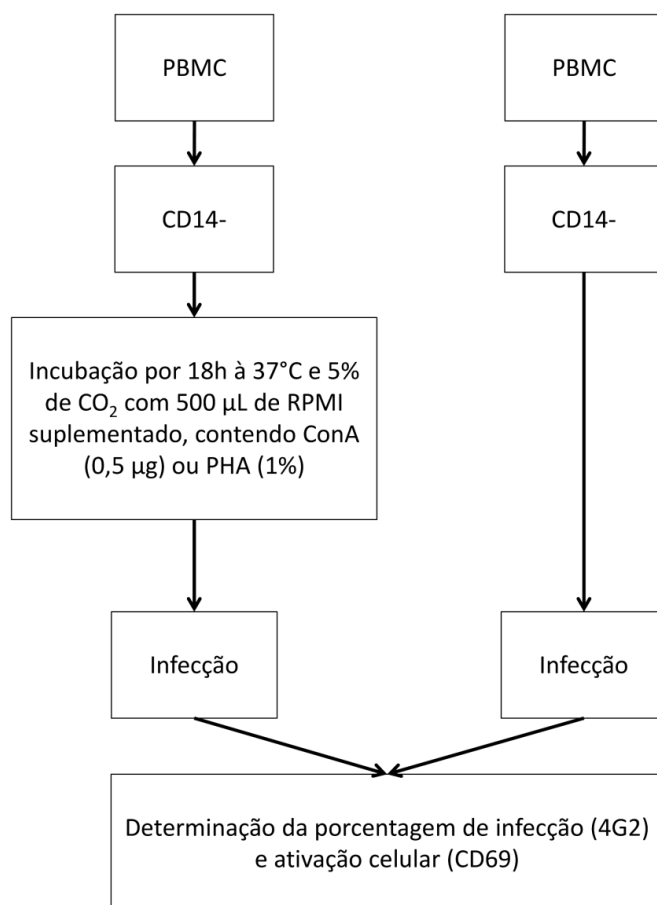


Diagrama 3.3 – Desenho experimental para a determinação do efeito da ativação celular na infecção pelo DV. Representação esquemática do desenho experimental adotado para as análises da ativação de linfócitos pela infecção com o DV (direita) e do efeito da ativação celular prévia na infecção pelo DV (esquerda).

3.8 Ativação celular

Visando determinar a porcentagem de ativação das populações linfocitárias após a infecção com o DV, foi determinada a expressão do marcador de superfície celular CD69, uma selectina C do tipo II, no quinto dia após a infecção. Para tanto, procedeu-se a infecção como descrito no item 3.2 e a marcação celular como no item 3.3, porém, substituindo-se o anticorpo anti-CD14 PE (BD, cat – 555398) pelo anticorpo anti-CD69 PE (BD, cat – 555531) (Diagrama 3.3).

Adicionalmente, para avaliar se a pré-ativação de linfócitos poderia impactar na infecção pelo DV, linfócitos totais (CD14⁻) foram tratados com 5 µg/mL de Concanavalina A (Reeke *et al.*, 1975) ou com 1% de PHA (Nakao *et al.*, 1975), dois importante agentes mitogênicos, por 18 horas. Após este período, as células foram lavadas e infectadas como descrito no item 3.2, sendo determinada a infecção e a ativação como descrito no parágrafo anterior.

3.9 Morte Celular

Além da susceptibilidade à infecção, foi determinada a porcentagem de morte celular nas culturas de linfócitos totais induzida pelo DV. Para tanto, após a infecção das PBMC, como descrito no item 3.2, dividiu-se a cultura em duas populações, sendo que a primeira foi analisada para a porcentagem de infecção como descrito em 3.3. Já a segunda foi imunomarcada com os kits “Annexin V: PE Apoptosis Detection Kit I” (BD, cat – 559763) ou “Image-iT® LIVE Red Poly Caspases Detection Kit” (Life, cat – I35101), como descrito pelos fabricantes. Brevemente, para o kit contendo Anexina V, $5,0 \times 10^5$ PBMC foram lavadas e recuperadas com 100 µL de “binding buffer” contendo 5 µL de Anexina V e mais 5 µL de 7-AAD (7-Aminoactinomycin D), sendo incubadas por 15 min a 37°C sob 5% de CO₂ protegidas da luz. Após a incubação, foi adicionado 100 µL de “binding buffer” e foi procedido a análise no citômetro de fluxo FACSCanto II. Já para os ensaios com o kit contendo o marcador de poli Caspases ativadas, $5,0 \times 10^5$ PBMC foram lavadas e recuperadas com 100 µL de solução de trabalho contendo FLICA 1x, proveniente do kit, sendo incubadas por 60 min a 37°C sob 5% de CO₂ protegidas da luz. Após a incubação, foi adicionado 100 µL de “binding buffer” e foi procedido a análise no citômetro de fluxo FACSCanto II. Ambos os resultados de morte celular foram comparados com as porcentagens de infecção.

3.10 Ensaio Misto de Leucócitos (EML)

Para analisar a influência da infecção pelo DV na proliferação de linfócitos, sangue total foi coletado de doadores distintos. As culturas de linfócitos totais foram obtidas, como descrito em 3.1, e posteriormente estas células foram infectadas como descrito em 3.2. Após os 5 dias de infecção com o DV, uma alíquota de cada cultura foi retirada e marcada para a determinação da infecção, utilizando-se para tanto o procedimento descrito no item 3.3, porém, sem a etapa de marcação de superfície. A porcentagem de infecção foi determinada por citometria de fluxo em FACSCanto II. Para as próximas etapas do EML foram utilizadas apenas as culturas positivas para a infecção pelo DV. As culturas infectadas foram marcadas com a molécula fluorescente CFSE por 10 min a 37°C. Após a incubação, foi adicionado 5 mL de SFB, sendo os tubos centrifugados a 1500 x g por 5 min, o sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas com RPMI completo em volume suficiente para manter a concentração celular em $5,0 \times 10^6$ cél/mL.

Da amostra de doador distinto foram obtidos os monócitos (CD14⁺), como descrito em 3.1, e estes foram induzidos à diferenciação em células dendríticas imaturas (imdDCs), segundo protocolo de Sallusto e Lanzavecchia de 1994 (Sallusto e Lanzavecchia, 1994). Brevemente, os monócitos foram incubados com RPMI completo contendo 100 ng/mL de IL-4 e 50 ng/mL de fator estimulante de colônias de monócitos e granulócitos (GM-CSF) por 7 dias à 37°C sob 5% de CO₂, realizando-se uma troca completa de meio no 3º ou 4º dias de cultivo. Após este período, as células foram recuperadas, sendo retirada uma alíquota destas para a determinação da porcentagem de diferenciação obtida. A alíquota foi então centrifugada a 5000 x g por 30 seg, recuperada com 50 µL de TB e incubada por 20 min a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado à suspensão celular, 50 µL de anticorpos que reconhecem proteínas de superfície, diluídos 1:25 em TB. Os anticorpos foram: anti-CD11c PE, anti-CD40 FITC e anti-HLA-ABC PE-Cy7 (BD, cat – 555392, 555588 e 561349), bem como, células foram incubados com os controles isotípicos. A suspensão celular foi então incubada por pelo menos 20 min a 37°C. Com o término da incubação, os tubos foram centrifugados a 5000 x g por 30 seg, o sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas com 200 µL de PBS e foram analisadas por citometria de fluxo em um FACSCanto II. Foram aceitas como imdDCs para o EML as culturas que apresentassem os marcadores

CD11c e HLA-ABC superior à 90% e CD40 inferior à 5%. As culturas adequadas quanto aos marcadores de superfície foram então recuperadas com RPMI completo em uma concentração final de $5,0 \times 10^5$ cél/mL.

Com os linfócitos totais infectados e marcados com CFSE, e as imdDCs com os fenótipos desejados, foi realizado um ensaio de co-cultivo entre células alogênicas, observando-se a proporção de 1 imdDCs para cada 10 linfócitos totais. Como controle de proliferação, 1% de PHA foi adicionado a uma alíquota dos linfócitos totais “Mock” de cada doador separadamente. Adicionalmente, culturas de linfócitos totais foram incubadas na presença de imdDCs autólogas, obtendo-se assim um controle negativo de proliferação. Estas culturas foram então incubadas em placas de 24 poços, com 500 μ L de RPMI completo a 37°C sob 5% de CO₂ por 5 dias. Após o período de incubação as células foram recuperadas e analisadas em um citômetro de fluxo FACSCanto II para a determinação da intensidade média de fluorescência (MFI) relativa ao sinal de CFSE (Diagrama 3.4).

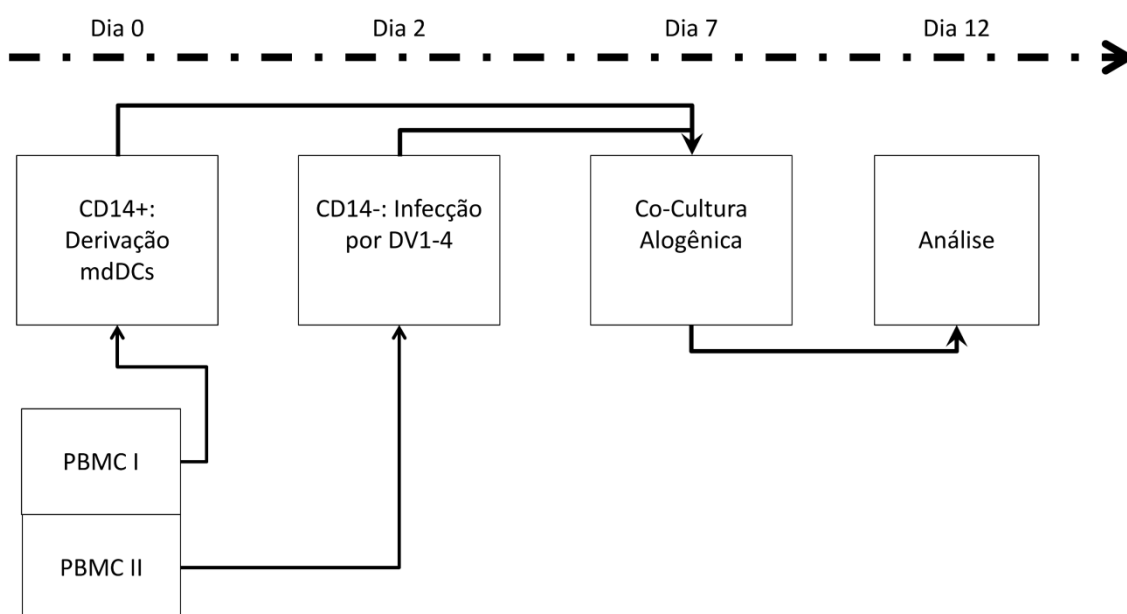


Diagrama 3.4 – Desenho experimental para a determinação do efeito do DV na proliferação de linfócitos durante o EML. Representação esquemática do desenho experimental adotado para as análises da influência dos DV na proliferação induzida pelo Ensaio Misto de Leucócitos.

3.11 Ensaio de “Prime” de Linfócitos (EPL)

No EPL, as células de doadores vacinados contra o vírus da Febre Amarela (YF), um vírus da família *Flaviviridae*, foram desafiadas utilizando-se partículas virais da cepa YF 17DD, a cepa vacinal do YF. Para tanto, linfócitos totais e monócitos de doadores vacinados foram obtidos segundo protocolo descrito em 3.1. Os monócitos

foram utilizados para a derivação em imdDCs, como descrito no item 3.10. Já os linfócitos totais foram infectados com o DV como descrito no item 3.2. Após os 5 dias de cultivo, foi determinada a porcentagem de infecção dos linfócitos totais, como descrito em 3.3. Para as culturas positivas para o DV, foi adicionado, em MOI de 10, cepa de YF 17DD sendo os estoques virais obtidos em nosso laboratório, como protocolo descrito em 3.2, porém utilizando-se a linhagem celular Huh7.5. Após 2 dias de cultivo, utilizando-se os linfócitos totais marcados com CFSE como protocolo descrito no item 3.10 e as imdDCs que possuíam fenótipo satisfatório, foi realizado um ensaio de co-cultivo entre células autólogas, observando-se a proporção de 1 imdDCs para cada 10 linfócitos totais. A este co-cultivo, foi adicionado cepa do vírus YF 17DD, em MOI de 10. Após 5 dias de cultivo, foi determinado o MFI referente ao marcador de proliferação celular, CFSE, utilizando-se para tanto FACSCanto II (Diagrama 3.5).

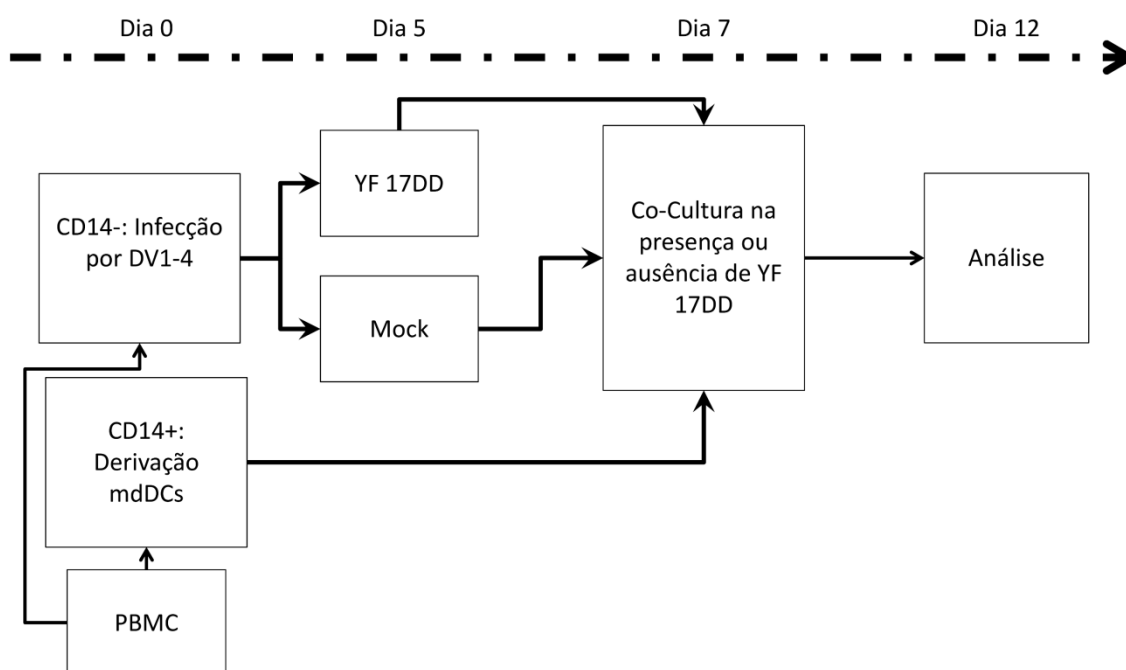


Diagrama 3.5 – Desenho experimental para a determinação do efeito do DV na proliferação de linfócitos durante o EPL. Representação esquemática do desenho experimental adotado para as análises da influencia dos DV na proliferação induzida pelo Ensaio de “Prime” de Linfócitos (EPL).

3.12 Degranulação Celular

No intuito de determinar se a infecção pelo DV seria capaz de induzir células CD8⁺ a secretar seus grânulos, linfócitos totais foram obtidos como descrito em 3.1 e infectadas como em 3.2. Após 5 dias de cultivo, estas células foram analisadas para

a determinação de marcadores de superfície, utilizando-se os anticorpos anti-CD8 PercP e anti-CD107a APC-H7 (BD, cat – 347314, 561343), bem como, células controle com os controles isotípicos, analisando-se as células em um citômetro de fluxo FACSCanto II. Adicionalmente, como controle, uma alíquota das culturas, antes do procedimento de marcação, foi tratada com 1% de PHA e novamente incubadas por 18 horas. Posteriormente à incubação, foi realizado o mesmo procedimento de marcação para análise por citometria de fluxo.

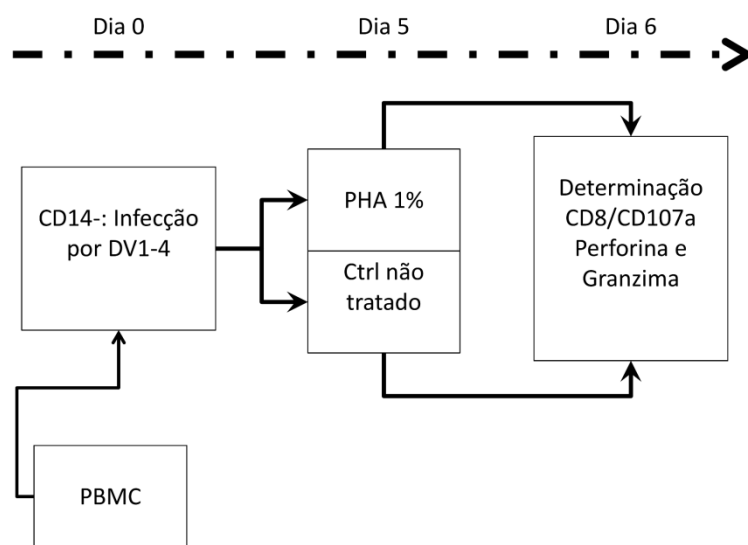


Diagrama 3.6 – Desenho experimental para a determinação do efeito do DV na degranulação de linfócitos T CD8⁺ e secreção de perforina e granzima. Representação esquemática do desenho experimental adotado para as análises da resposta de degranulação de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺/CD107a⁺) e da secreção de perforinas e granzimas no sobrenadante de culturas de linfócitos infectada pelo DV.

O sobrenadante dos linfócitos totais infectados com os DV tratados ou não tratados com PHA, foram avaliados para os níveis de granzima e perforina. As dosagens de granzima foram realizadas como descrito no item 3.7, porém utilizando-se o kit “Cytometric Bead Array Human Granzyme A Flex Set” (BD, cat – 560299). Já para a determinação da perforina, foi utilizando o kit “Perforin Human ELISA Kit” (Abcan, cat – ab46115), segundo recomendações do fabricante. Brevemente, foi adicionado 100 µL de sobrenadante de culturas ou curvas controle nos poços da placa de reação. Após incubação por 1 hora a T.A. protegido da luz, os poços foram lavados com 300 µL de solução de lavagem, por 3 vezes. Aos poços foi então adicionado 50 µL do reagente “biotinylated anti-Perforin”, sendo incubado por 1 hora a T.A. protegido da luz. Após esta incubação, os poços foram lavados como

anteriormente e foi adicionado 100 µL de solução HRP, sendo incubado por 20 minutos a T.A. protegido da luz. Após a incubação, os poços foram lavados como anteriormente e foi adicionado 100 µL de solução TMB, sendo incubado por 10 minutos a T.A. protegido da luz. Aos poços foram adicionados 100 µL de solução de 1M de H₂SO₄, sendo procedida com a determinação da D.O. da absorbância utilizando-se os filtros de 450 nm e 620 nm. Os cálculos para a determinação das concentrações foram realizados utilizando-se a curva controle segundo indicação do fabricante (Diagrama 3.6).

3.13 Polarização Th1/Th2/Th17

Para determinar se linfócitos T CD4⁺ são induzidos à polarização após infecção pelo DV, foi realizado procedimento de enriquecimento celular por “cell-sorting”, como descrito no item 3.1, sendo estas culturas comparadas com culturas de PBMC. As culturas enriquecidas em linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e as culturas de PBMC foram infectadas como descrito no item 3.2 e após a incubação, uma alíquota foi retirada para a determinação da porcentagem de infecção, utilizando-se para tanto o protocolo descrito em 3.3. O restante das culturas foi tratado com o reagente “BD GolgiStop”, proveniente do kit “Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit” (BD, cat – 560751). Após 24 horas de incubação, as culturas foram recuperadas e tratadas como recomenda o fabricante. Brevemente, as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 5000 x g por 30 seg, foram recuperadas com 100 µL de “BD Cytotfix Fixation Buffer”, e incubadas por 20 min a T.A. protegidas da luz. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de “BD Perm/Wash”, e centrifugadas a 5000 x g por 30 seg. O sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas em 100 µL de “Buffer Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Cocktail”, incubadas por 20 min a 37°C. Após este período, foram adicionados 100 µL de “BD Perm/Wash”, e as culturas foram centrifugadas a 5000 x g por 30 seg. O sobrenadante foi desprezado e as células foram recuperadas em 200 µL de PBS, sendo procedido a análise da marcação em um citômetro de fluxo FACSCanto II (Diagrama 3.7).

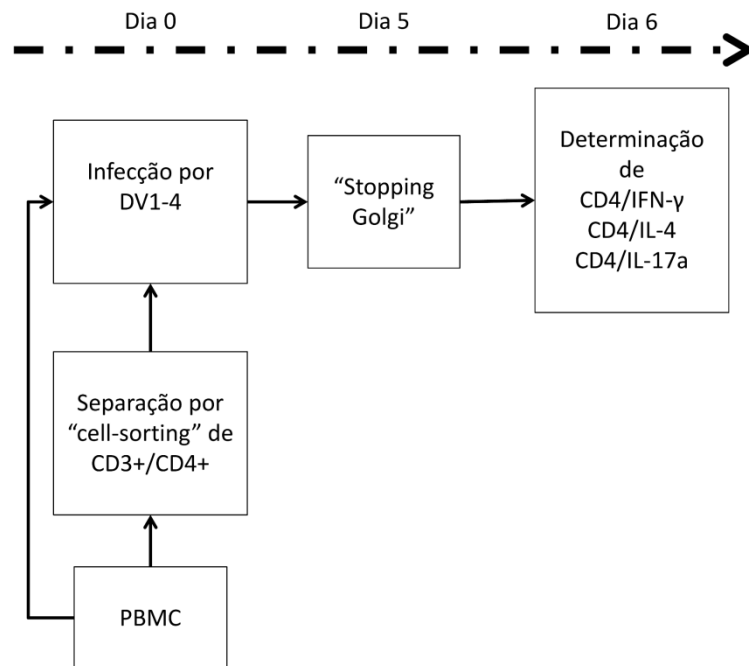


Diagrama 3.7 – Desenho experimental para a determinação da polarização de linfócitos T CD4⁺ após infecção por DV. Representação esquemática do desenho experimental adotado para as análises da polarização de linfócitos T auxiliares induzida pelos DV.

3.14 Infecções de populações de células CD8⁺ "naïve" e de memória

No intuito de determinar a susceptibilidade seletiva de linfócitos T CD8⁺ "naïve" e de memória frente ao DV, bem como, e a resposta funcional destas células, foi realizado o enriquecimento das culturas por "cell-sorting", como descrito no item 3.1, porém substituindo-se o anticorpo anti-CD14 FITC (BD, cat – 557700) por anti-CD45RA FITC (BD, cat – 555488) e adicionando-se o anticorpo anti-DC45RO APC-H7 (BD, cat – 561137), bem como, células com os controles isotópicos. As culturas enriquecidas foram então infectadas como descrito no item 3.2, sendo determinado após 5 dias, a porcentagem de infecção utilizando-se protocolo descrito em 3.3. O sobrenadante destas culturas enriquecidas foi ainda testado para os níveis de granzima, sendo que este procedimento foi realizado de acordo com o protocolo descrito no item 3.7, porém utilizando-se o kit "Cytometric Bead Array Human Granzyme A Flex Set" (BD, cat – 560299).

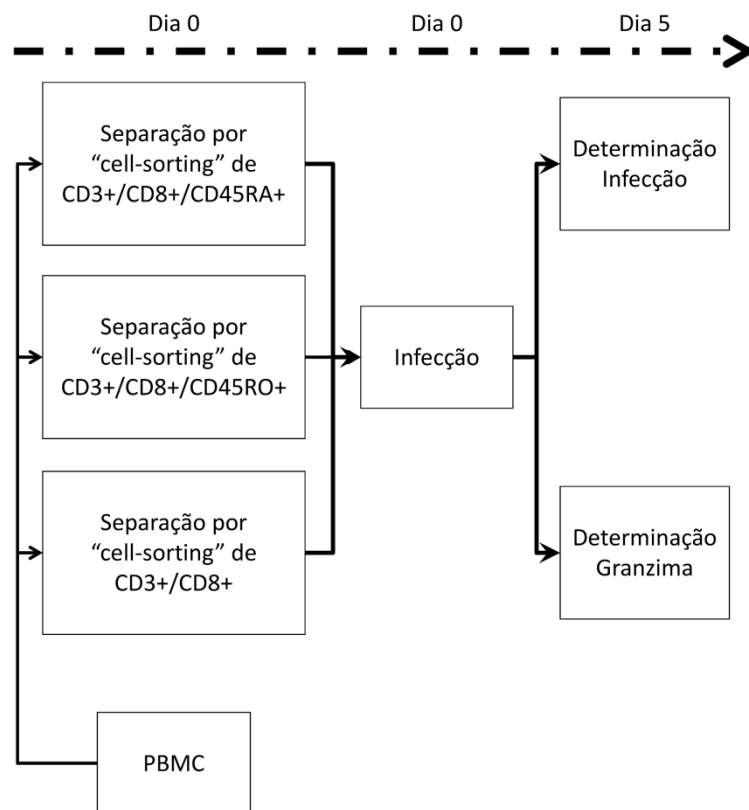


Diagrama 3.8 – Desenho experimental para a determinação da infecção pelo DV e da secreção de granzima em linfócitos T CD8⁺ "naive" e memória. Representação esquemática do desenho experimental adotado para as análises de infecção e secreção de granzima por culturas enriquecidas em linfócitos CD3⁺/CD8⁺/CD45RA⁺ e CD3⁺/CD8⁺/CD45RO⁺ frente aos DV.

3.15 Produção de IgM contra DV por linfócitos B CD19⁺

Objetivando determinar se culturas enriquecidas em linfócitos B CD19⁺ teriam a capacidade de liberar IgM frente a infecção pelo DV, foram obtidas culturas enriquecidas de linfócitos B CD3⁺/CD19⁺, utilizando-se o protocolo de "cell-sorting" descrito em 3.1. Juntamente com PBMC, as culturas enriquecidas foram infectadas, como descrito no protocolo do item 3.2, e posteriormente foi determinada a porcentagem de infecção como descrito em 3.3. Adicionalmente, foi determinado no sobrenadante das culturas a presença de IgM contra os DV, utilizando-se o kit diagnóstico "Dengue IgM Capture ELISA" (Panbio, cat – E-DEN01M). Para realização do procedimento foram seguidas as orientações do fabricante, como descrito no item 3.4.

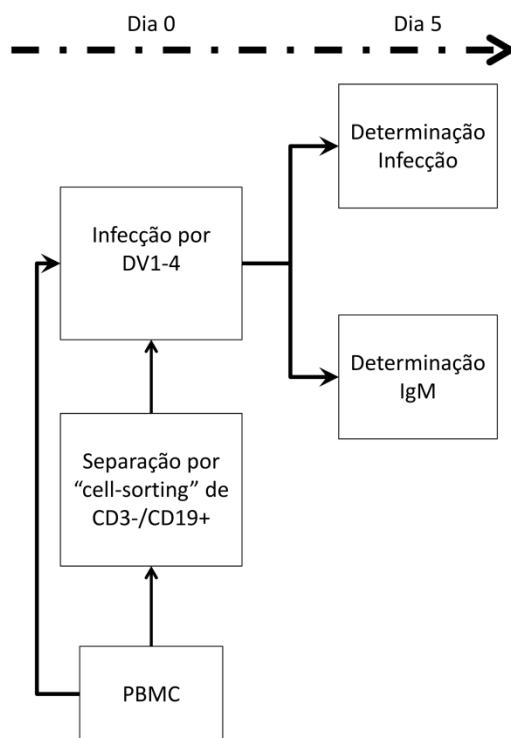


Diagrama 3.9 – Desenho experimental para a determinação da infecção pelo DV e da secreção de IgM em linfócitos B CD19⁺. Representação esquemática do desenho experimental adotado para as análises de infecção e secreção de IgM em culturas enriquecidas em linfócitos CD3⁻/CD19⁺ frente aos DV.

3.16 Análises Estatística

Os resultados foram estatisticamente avaliados pelo método “two-way” ANOVA seguido pela correção de Bonferroni, e foram confirmados pelo teste “Student's t” sendo considerada a hipótese nula de 5% ($p < 0,05$). Para tanto, foi utilizando o programa Prism v5.1 (GraphPad Software).

4 RESULTADOS

4.1 Linfócitos humanos são susceptíveis à infecção pelo DV

Não existe consenso na literatura quanto à susceptibilidade dos linfócitos frente à infecção pelos DV, tendo sido publicado trabalhos que indicam que as células são infectadas (Kurane *et al.*, 1986; Mentor e Kurane, 1997; King *et al.*, 1999) e outros mostrando que os linfócitos não são infectados (Blackley *et al.*, 2007; Kou *et al.*, 2008).

Deste modo, o primeiro ponto deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade de linfócitos humanos à infecção por cepas dos quatro sorotipos de DV, *ex vivo*. Para tanto, culturas de PBMC foram infectadas com DV e analisadas por citometria de fluxo. Na Figura 4.1 é possível observar a estratégia de “gate” utilizada para a determinação da porcentagem relativa de células infectadas para cada população celular em PBMC.

Com base nos dados de tamanho e granulosidade (FSC/SSC) das PBMC, “gates” foram desenhados para selecionar as populações linfocitárias e monocíticas (Figura 4.1A). Nos experimentos subsequentes as posições destes “gates” foram confirmadas pela presença dos marcadores CD3⁺ e CD14⁺, respectivamente (Figura 4.4). Para determinar a presença de DV em diferentes populações celulares, PBMC, monócitos ou linfócitos totais foram analisados utilizando-se o anticorpo monoclonal 4G2 (Figura 4.1B). A população linfocitária foi novamente segregada, agora para a análise da população de linfócitos em: CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ (Figura 4.1C). As células CD14⁺ foram utilizadas como controle positivo de infecção, uma vez que a susceptibilidade desta população a infecção pelo DV já é conhecida (O'sullivan e Killen, 1994). Com esta estratégia foi possível determinar as porcentagens relativas de células infectadas em cada população celular (Figura 4.1D).

Quando foram analisadas as porcentagens de células infectadas, as diferentes populações de CD14⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ mostraram-se positivas para a presença do DV (4G2⁺), em diferentes níveis (Figura 4.2A e C). Com a determinação da média de porcentagem de infecção em todas as condições de infecção, foi observado um perfil de 28,67% para CD14⁺; 4,21% para CD4⁺; 19,36% para CD8⁺ e 7,74% para CD19⁺ (Figura 4.2C). É interessante observar que a susceptibilidade a infecção foi a mesma para as quatro cepas de DV testadas, mesmo em culturas de populações celulares enriquecidas pós “cell-sorting” (CD14⁺, CD4⁺, CD8⁺ ou CD19⁺),

não havendo diferenças significativas dentro da mesma população celular. Isso pode indicar que a susceptibilidade dos linfócitos (e monócitos) é independente do sorotipo da cepa testada (Figura 4.2C). Adicionalmente, os monócitos (CD14⁺) e os LT CD8⁺ são as células mais susceptíveis à infecção quando comparados aos LT CD4⁺ e LB CD19⁺ (Figura 4.2C). Buscando confirmar o resultado obtido por citometria de fluxo, as mesmas culturas foram analisadas por microscopia confocal (Figura 4.2B). Neste caso observou-se novamente a positividade para a presença do DV (vermelho) em cada uma das populações analisadas (Figura 4.2B). Quando foram determinadas as unidades formadoras de foco em C6/36 presentes no sobrenadante das culturas, foi demonstrada uma infecção produtiva, isto é, com a produção de partículas virais infectivas (Figura 4.2D). Este dado corrobora os resultados de citometria de fluxo (Figura 4.2A e C) e microscopia confocal (Figura 4.2B).

A população de PBMC é complexa, sendo formada por diferentes tipos celulares, poderia ocorrer a influência da infecção das células CD14⁺ sobre a infecção das populações linfocitárias. Uma vez que os monócitos (CD14⁺) são infectados, esta infecção poderia gerar partículas virais viáveis, modificando assim a relação linfócitos-vírus presente (Figura 4.2C). No intuito de eliminar a influência das células CD14⁺, culturas de linfócitos totais de doadores saudáveis foram analisadas objetivando determinar a suscetibilidade ao DV. Neste novo experimento, a porcentagem de células positivas para a infecção foi em média 8,51% para CD4⁺, 19,35% para CD8⁺ e 11,29% para CD19⁺ (Figura 4.3A e B), sendo semelhante ao encontrado no experimento anterior (Figura 4.2). Adicionalmente, as infecções apresentaram-se a mesma independente do sorotipo da cepa testada para cada população celular isolada. Neste mesmo ensaio foi determinada em células C6/36 a geração da progênie viral, onde foram observadas infecções produtivas, mesmo na ausência das células CD14⁺ (Figura 4.3C). Cabe ainda salientar que, como demonstrado anteriormente (Figura 4.2), os LT CD8⁺ são mais susceptíveis a infecção que os LT CD4⁺ e LB CD19⁺ (Figura 4.3).

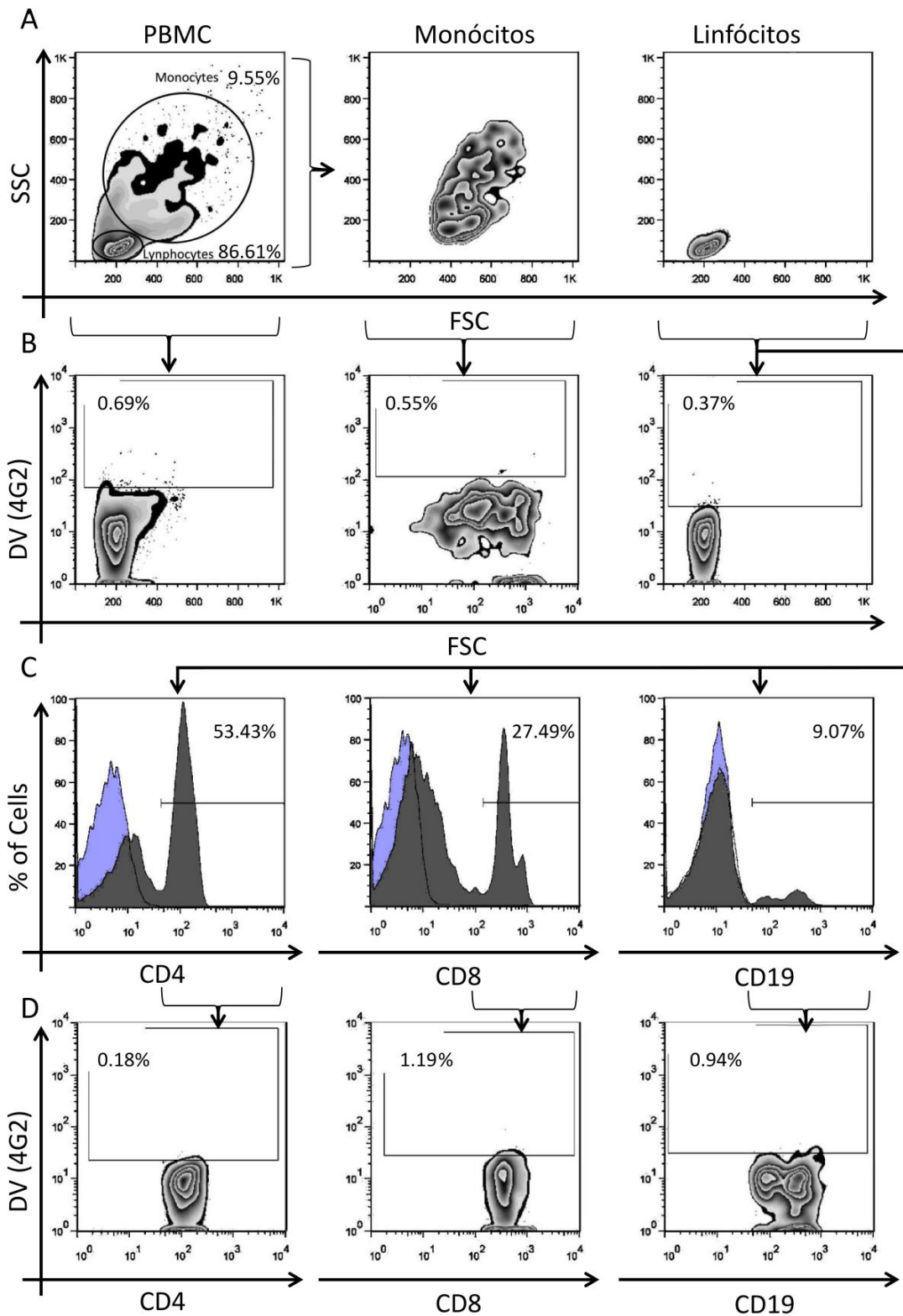


Figura 4.1 – Estratégia de análise para a determinação da infecção relativa em subpopulações de PBMC. Exemplo representativo de análise em Mock para a determinação da porcentagem de infecção nas subpopulações celulares que compõem o PBMC. (A) Determinação morfológica (FSC/SSC) das populações celulares monocíticas e linfocitárias provenientes de PBMC. (B) Obtenção das porcentagens de infecção para o controle Mock em cada população isolada em A. (C) Na população linfocitária determinada morfológicamente em A, foram isoladas três populações de linfócitos: CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺. (D) Determinação da infecção para o controle Mock nas populações linfocitárias isoladas em C.

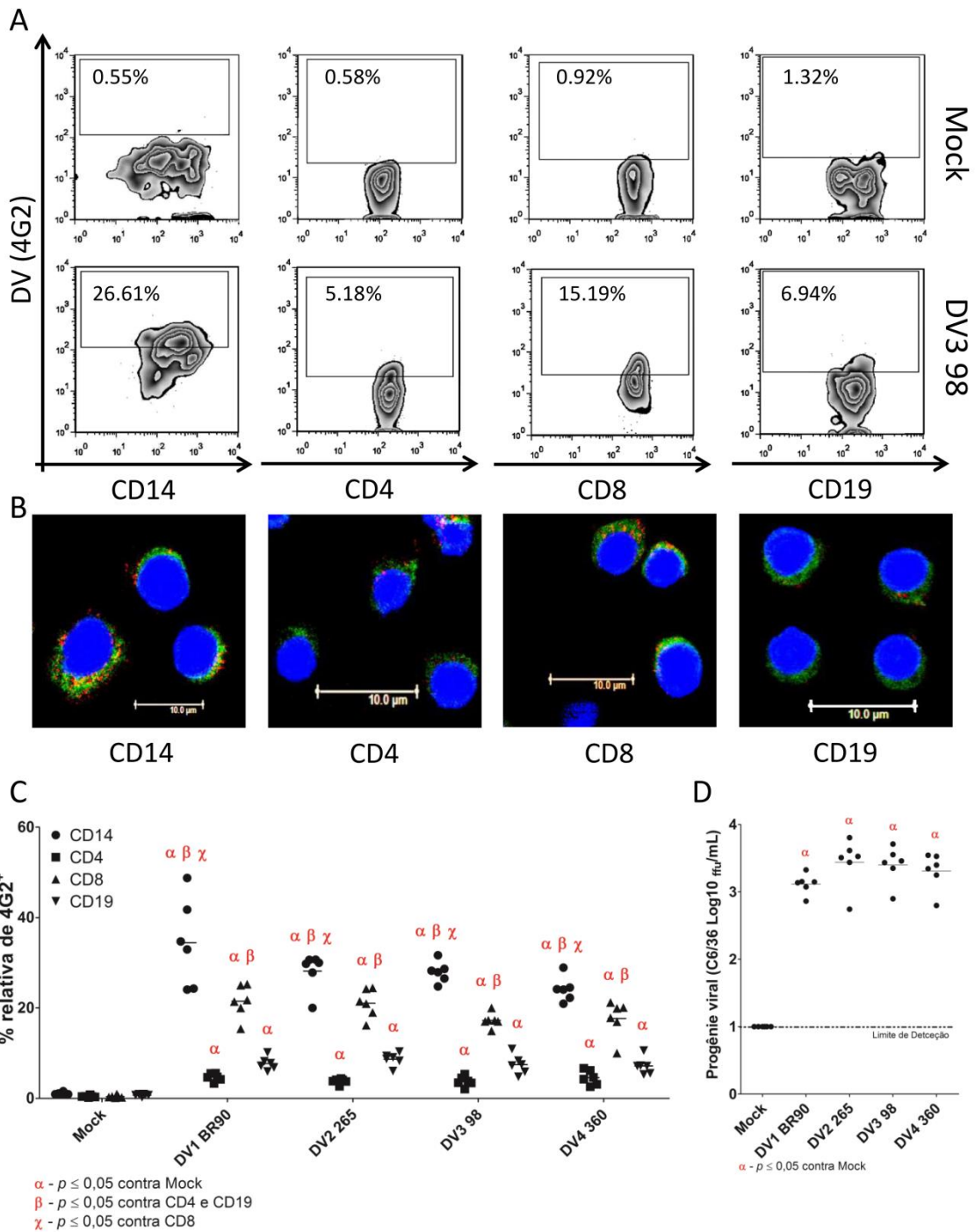


Figura 4.2 – Diferentes populações em PBMC são infectadas por cepas dos quatro sorotipos do DV. Infecção *ex vivo* de PBMC de doadores saudáveis por cepas dos quatro sorotipos de DV. (A) Exemplo representativo de zebra para a porcentagem de células infectadas por DV3 98 em diferentes populações de células: monocíticas (CD14⁺) e linfocitárias (CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺); que compõem o PBMC. (B) Fotomicroscopia de fluorescência de diferentes populações celulares apresentando marcações para DNA (DAPI - azul), DV (anti-proteína E – vermelho) e marcadores de imunofenotipagem celular (anti-CD14, anti-CD4, anti-CD8 ou anti-CD19 – verde). (C) Média da porcentagem de infecção pelos quatro sorotipos de DV em PBMCs (monócitos e linfócitos) de seis doadores distintos. (D) Número de unidades formadoras de foco por mL em células C6/36 presentes no sobrenadante das culturas de PBMCs infectadas pelo DV ou Mock. α = $p \leq 0,05$ contra Mock; β = $p \leq 0,05$ contra CD4⁺ e CD19⁺ e χ = $p \leq 0,05$ contra CD8⁺.

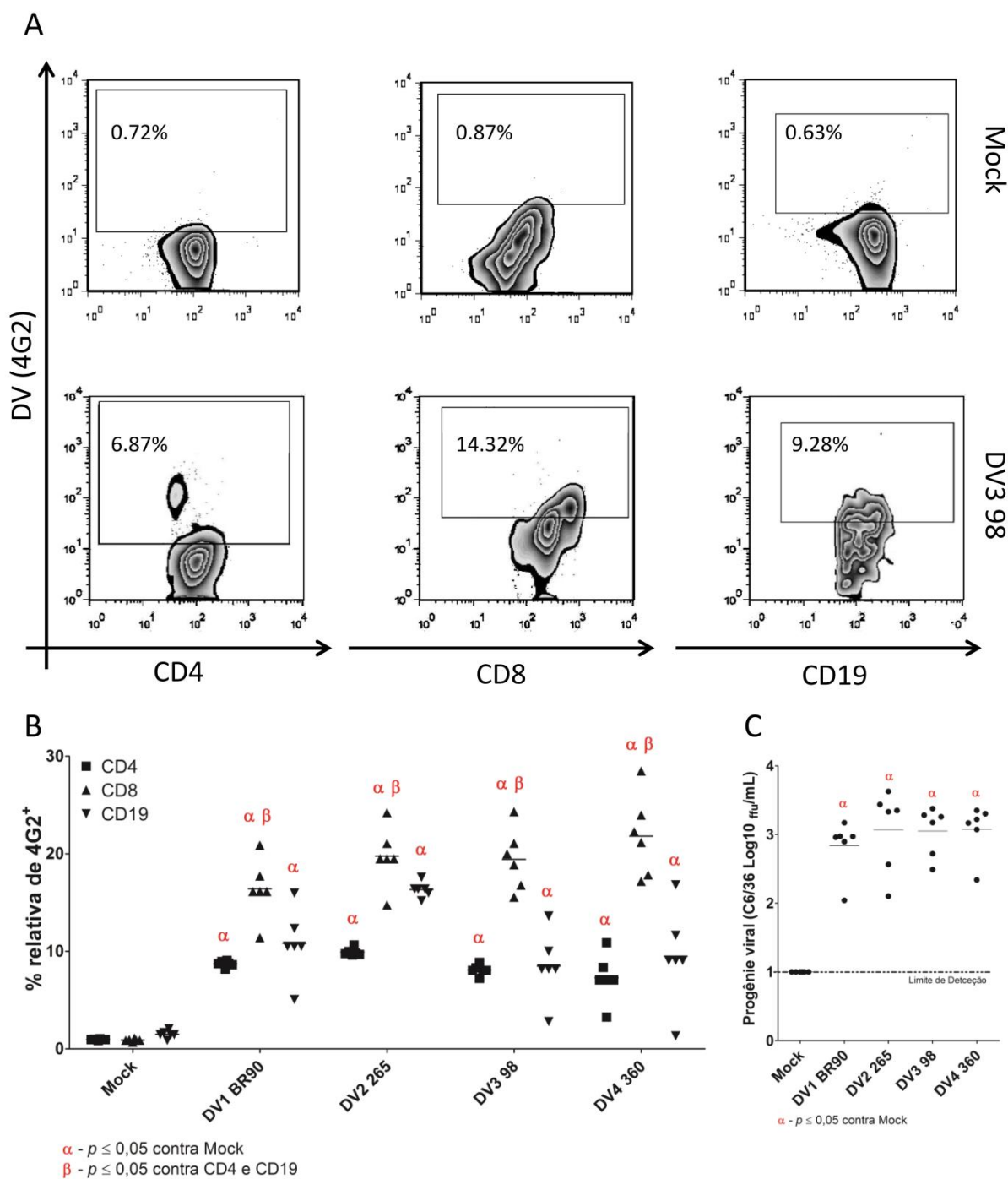


Figura 4.3 – Diferentes populações em linfócitos totais são infectadas por cepas dos quatro sorotipos do DV. Infecção *ex vivo* de linfócitos de doadores saudáveis por cepas de DV. (A) Exemplo representativo de zebra de um doador para a obtenção da porcentagem de células infectadas pelo DV3 98 em diferentes populações de células linfocitárias (CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺). (B) Média da porcentagem de infecção por cepas dos quatro sorotipos de DV em PBMCs (monócitos e linfócitos) de seis doadores distintos (C) Número de unidades formadoras de foco por mL em células C6/36 presentes no sobrenadante das culturas de linfócitos infectados pelos DV ou Mock. α = $p \leq 0,05$ contra Mock e β = $p \leq 0,05$ contra CD4⁺ e CD19⁺.

Nas populações de linfócitos totais a relação célula-vírus para cada linhagem isolada é comparativamente diferente, devido a diferenças na proporção entre LT CD4⁺, LT CD8⁺ e LB CD19⁺ presentes nas culturas. Esta condição poderia influenciar na taxa de infecção observada nos linfócitos. Para corrigir as diferenças na relação célula-vírus, foram obtidas culturas enriquecidas para as populações de linfócitos (Figura 4.4) através da técnica de “cell-sorting”. Para o controle positivo das infecções realizadas neste experimento foram obtidas culturas enriquecidas de monócitos CD14⁺ (Figura 4.4). Todos os procedimentos de “cell-sorting” resultaram em culturas com populações contendo acima de 91% de pureza (Figura 4.4). Com este grau de enriquecimento, foi possível normalizar a relação célula-vírus para todas as linhagens estudadas.

A análise das médias das porcentagens de infecção para as quatro cepas em seis culturas enriquecidas distintas demonstrou 8,56% em CD4⁺, 25,91% em CD8⁺ e 10,04% em CD19⁺ de infecção (Figura 4.5). Estes dados concordam com os obtidos nos experimentos anteriores, indicando que as populações linfocitárias possuem diferentes níveis de susceptibilidade à infecção pelos DV, sendo os LT CD8⁺ mais susceptíveis ao DV que os LT CD4⁺ e LB CD19⁺ (Figura 4.5).

Além da porcentagem de infecção, foi determinada novamente a progênie viral nos sobrenadantes das culturas. Os valores obtidos demonstram que para todas as condições de cultivo foram detectadas partículas virais infectivas (Figura 4.6A). Neste ensaio, não foram observadas diferenças significativas entre as culturas, o que pode ter relação com a sensibilidade do ensaio de focos. Foi observado, porém, uma tendência de aumento do número de unidades formadoras de foco nas culturas de LT CD8⁺ (Figura 4.6A), corroborando os dados de infecção (Figura 4.5).

Adicionalmente, visando confirmar a susceptibilidade dos linfócitos a infecção por DV, a replicação viral foi analisada por RT-qPCR para o gene da proteína viral NS3 nos diferentes grupos de culturas enriquecidas (Figura 4.6B). De maneira geral, todas as culturas apresentaram níveis diferenciais de replicação viral, com média de 985,47 vezes de aumento em relação ao Mock para os LT CD8⁺, 553,61 vezes para LT CD4⁺ e 578,16 vezes para LB CD19⁺ (Figura 4.6B). Esta diferença confirma os dados de citometria de fluxo (Figura 4.5) e progênie viral (Figura 4.6A).

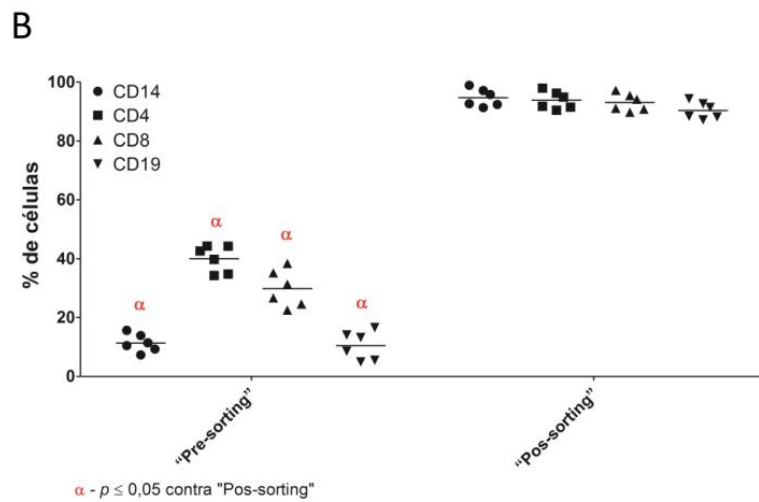
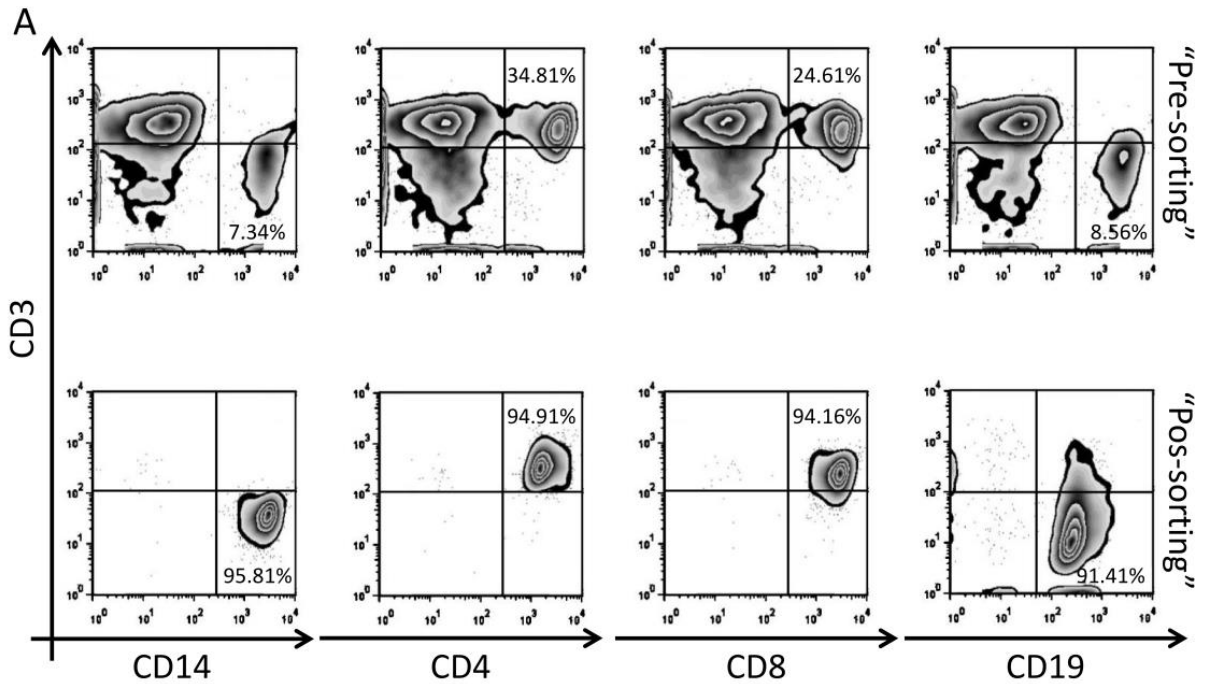


Figura 4.4 – Enriquecimento por “cell-sorting” das diferentes sub-populações de PBMC. (A) Exemplo representativo de zebra com estratégia de “cell-sorting” para a obtenção de populações enriquecidas de monócitos (CD3⁻/CD14⁺) e LT auxiliar (CD3⁺/CD4⁺), LT citotóxico (CD3⁺/CD8⁺) e LB (CD3⁻/CD19⁺). (B) Médias das porcentagens em seis culturas de células enriquecidas. $\alpha = p \leq 0,05$ contra “Pos-sorting”.

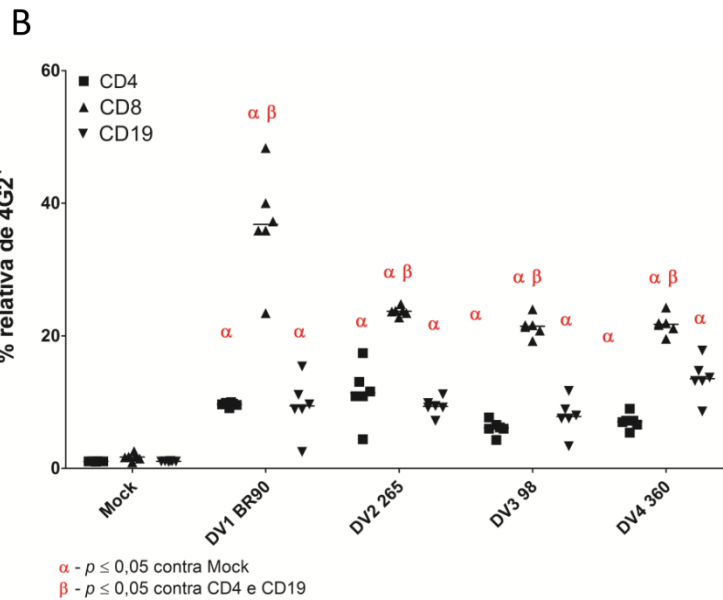
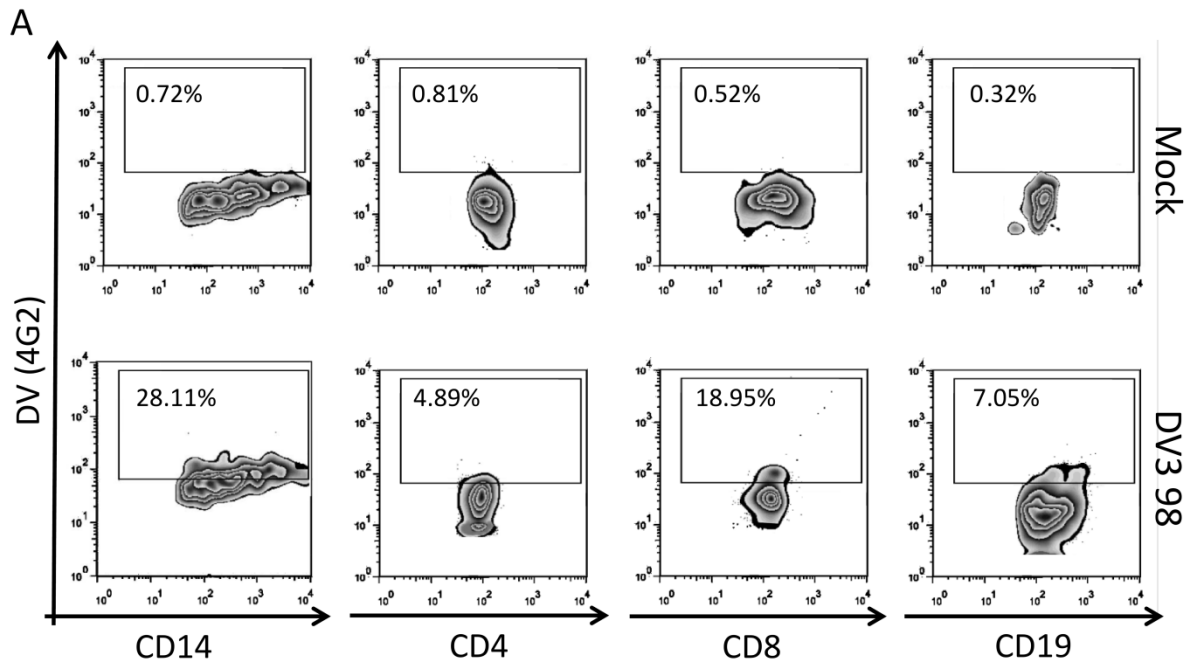


Figura 4.5 – Diferentes populações de linfócitos (CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺) são infectadas pelo DV em culturas enriquecidas por “cell-sorting”. (A) Exemplo representativo de zebra da porcentagem de células infectadas em diferentes populações de culturas enriquecidas para células monocíticas (CD14⁺) e linfocitárias (CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺). (B) Média da porcentagem infecção em seis culturas de doadores saudáveis infectadas pelos quatro sorotipos de DV em cada uma das populações de linfócitos. α = $p \leq 0,05$ contra Mock e β = $p \leq 0,05$ contra CD4⁺ e CD19⁺.

Outro parâmetro analisado foi à presença da proteína viral NS1 no sobrenadante das culturas. Para todas as condições do ensaio foram obtidas diferenças significativas entre os níveis desta proteína no sobrenadante das culturas infectadas com DV, comparadas com o Mock, evidenciando a infecção (Figura 4.6C). Uma vez que este ensaio é qualitativo, não foi possível observar diferenças entre os níveis da proteína NS1 no sobrenadante das culturas das diferentes populações de linfócitos.

Analisando em conjunto os resultados de porcentagem de infecção (Figura 4.5), progênie viral (Figura 4.6A), replicação viral (Figura 4.6B) e presença de NS1 (Figura 4.6C), não foram observadas diferenças entre as cepas virais testadas, o que confirma que a susceptibilidade dos linfócitos ao DV deva ser cepa-independente. Esses dados também indicam que a infectividade viral e a susceptibilidade das populações linfocitárias estudadas não são afetadas na presença de outras células mononucleares.

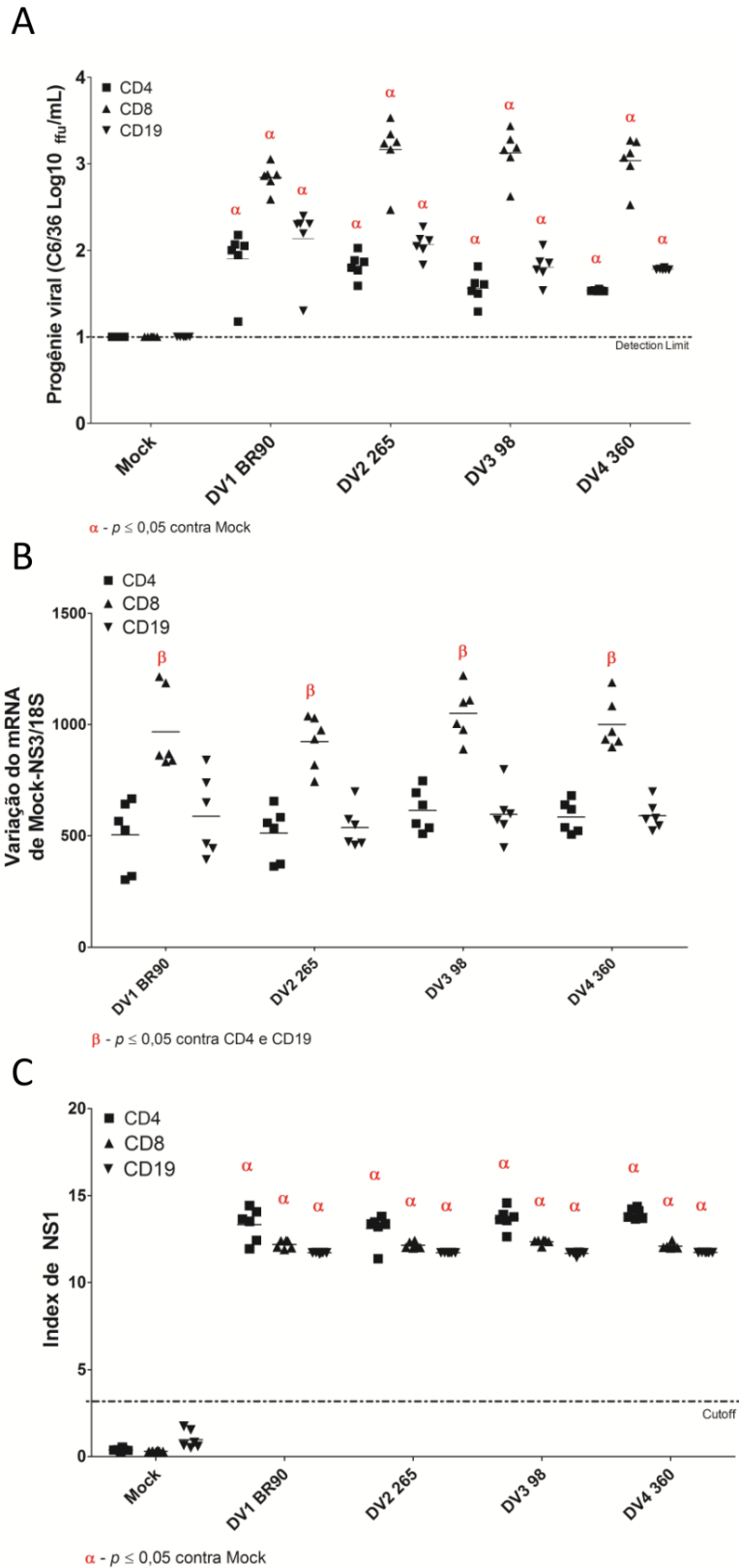


Figura 4.6 – A infecção de diferentes populações de linfócitos pelo DV é produtiva, em culturas enriquecidas após “cell sorting”. Média das infecções de seis culturas de doadores distintos. (A) Número de unidades formadoras de foco por mL em células C6/36 presentes no sobrenadante das culturas de linfócitos infectados pelo DV ou Mock. (B) Replicação viral determinada pela variação no mRNA da proteína viral NS3 presente nas células infectadas, frente ao Mock, normalizadas com gene “housekeeping” 18S. (C) Presença de NS1 no sobrenadante das culturas de populações de linfócitos infectadas pelo DV. $\alpha = p \leq 0,05$ contra Mock e $\beta = p \leq 0,05$ contra CD4⁺ e CD19⁺.

4.2 O heparan sulfato é um receptor de entrada do DV em linfócitos humanos

Uma vez determinada a susceptibilidade de linfócitos humanos a infecção pelo DV *ex vivo*, foram realizados ensaios para investigar o potencial receptor de entrada do DV nessas células. O heparan sulfato já foi caracterizado como um receptor de entrada do DV em células de ovário do hamster chinês [CHO (Chen *et al.*, 1997)], de epitélio renal de macaco [VERO (Germi *et al.*, 2002)], em hepatomas humanos [Huh7.5 (Hilgard e Stockert, 2000)] e em células primárias endoteliais humanas (Dalrymple e Mackow, 2011). Adicionalmente, já foi demonstrada a presença de moléculas de heparan sulfato na superfície de linfócitos (Ibrahim *et al.*, 1999; Bao *et al.*, 2010). Visando verificar se o heparan sulfato poderia ser um receptor para a entrada do DV em linfócitos humanos, cepas dos quatro sorotipos de DV foram incubadas com concentrações crescentes da molécula análoga ao heparan sulfato, a heparina. Esta molécula poderia se ligar à proteína E dos DV, bloqueando assim a interação célula-vírus (Dalrymple e Mackow, 2011). A análise dos resultados demonstrou que ocorreu uma diminuição na porcentagem de infecção de LT CD4⁺ (Figura 4.7B), LT CD8⁺ (Figura 4.7A e C) e LB CD19⁺ (Figura 4.7D), sendo esta redução proporcional à concentração de heparina utilizada.

No intuito de comprovar estes dados, linfócitos totais foram tratados com concentrações crescentes de heparinase, enzima capaz de clivar o heparan sulfato presente na superfície celular. Novamente, foi observada uma redução na porcentagem de infecção, seja para LT CD4⁺ (Figura 4.8B), LT CD8⁺ (Figura 4.8A e C) ou LB CD19⁺ (Figura 4.8D), sendo esta redução novamente dose dependente. Em ambos os ensaios, não foram detectadas diferenças entre as cepas de DV, indicando um mecanismo de entrada dos DV nos linfócitos humanos independente do sorotipo da cepa testada.

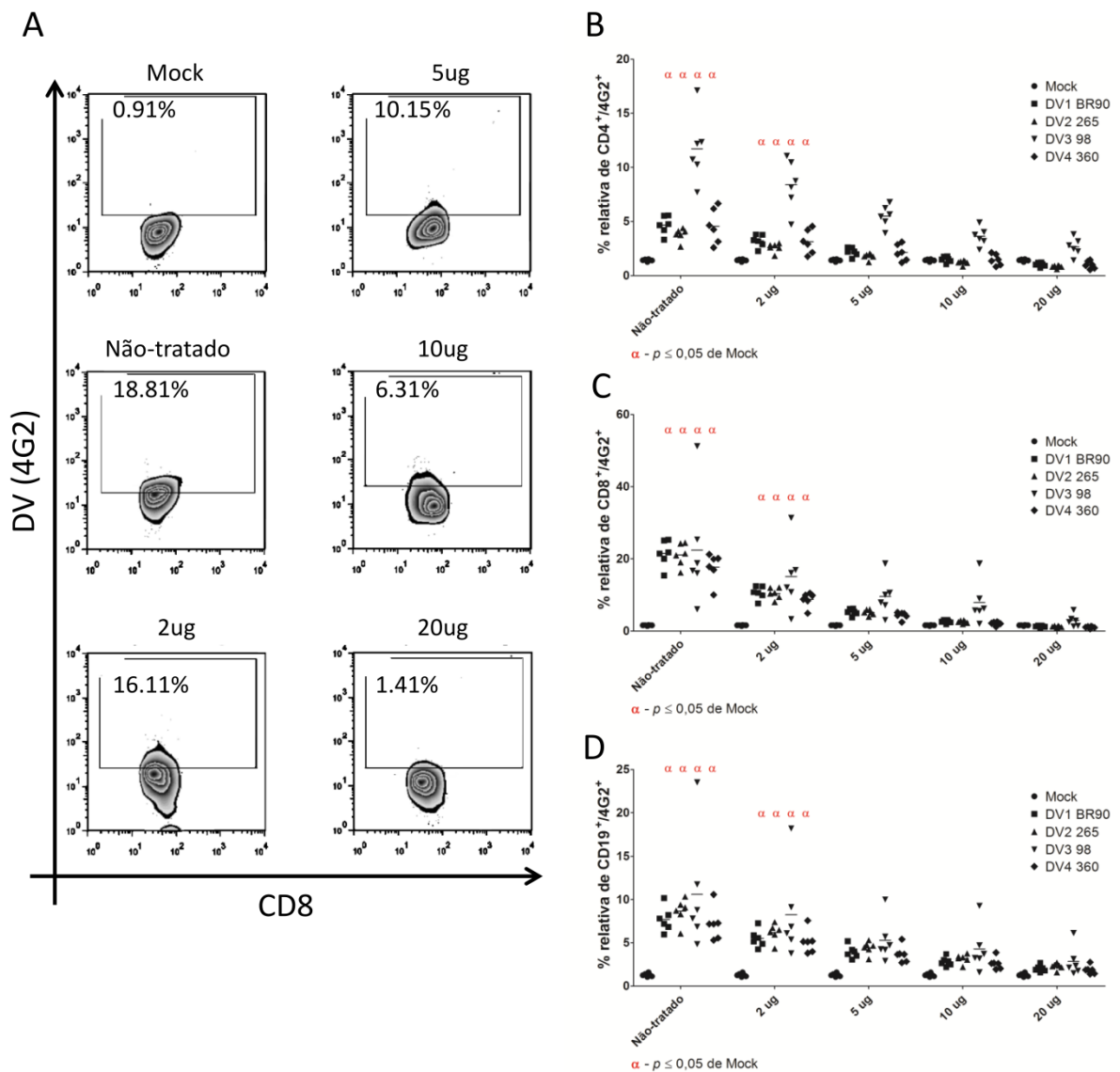


Figura 4.7 – O tratamento das diferentes cepas de DV com heparina diminui a porcentagem de infecção dos linfócitos humanos. (A) Exemplo representativo de zebra para a obtenção da porcentagem de células infectadas por DV3 98 após incubação com heparina em diferentes concentrações. Médias das porcentagens de infecção em culturas de LT CD4⁺ (B), LT CD8⁺ (C) ou LB CD19⁺ (D) de seis doadores distintos infectadas com DV tratados com heparina em diferentes concentrações. α = p ≤ 0,05 contra Mock.

A análise do conjunto dos dados permite sugerir que a molécula de heparan sulfato presente na superfície de linfócitos está envolvida na susceptibilidade destas células a infecção por DV. Os níveis de infecção foram reduzidos proporcionalmente às concentrações de heparina ou heparinase utilizados.

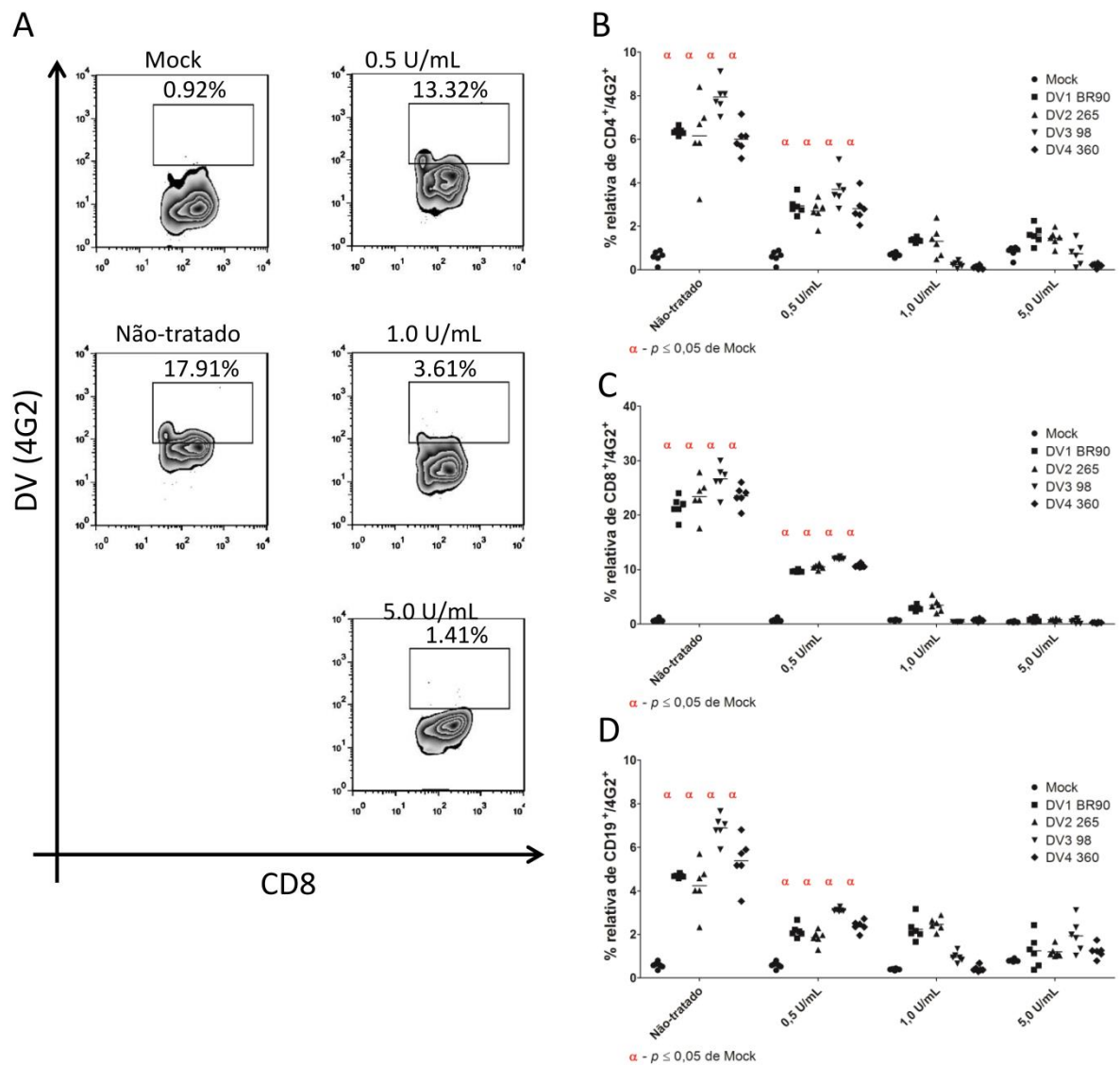


Figura 4.8 – Linfócitos totais tratados com heparinase apresentam menor susceptibilidade à infecção pelo DV. (A) Exemplo representativo de zebra para a obtenção da porcentagem de células infectadas (DV3 98) após tratamento com diferentes concentrações de heparinase. Médias das porcentagens de infecção de LT CD4⁺ (B), LT CD8⁺ (C) ou LB CD19⁺ (D) de seis doadores distintos após tratamento com heparinase e infectadas por DV. α = p ≤ 0,05 contra Mock.

Uma vez demonstrado que os linfócitos são infectados, foram realizados ensaios para caracterizar quais seriam as respostas funcionais destas células.

4.3 Resposta funcional de linfócitos T e B à infecção pelo DV

4.3.1 A produção de citocinas pelas PBMC infectadas pelo DV ocorre em baixos níveis

Já foi demonstrado que a patogênese da dengue teria relação direta com a produção de citocinas. Segundo esta hipótese, a ligação de baixa avidéz dos linfócitos T aos antígenos virais levaria à ativação celular, induzindo à produção de citocinas pró-inflamatórias, porém com uma baixa eficiência de eliminação das células infectadas (Azeredo *et al.*, 2001; Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Neste contexto, para todas as condições de infecção testadas, sejam elas PBMC, linfócitos totais, culturas enriquecidas em LT CD4⁺, LT CD8⁺ ou LB CD19⁺, os níveis das citocinas IL-4, IL-2, IL-6 ou IL-17A detectados não foram significativamente diferentes comparando-se culturas infectadas pelo DV com o Mock (dados não mostrados). Já para as citocinas de perfil Th1, níveis de secreção significativamente diferenciais foram detectados no sobrenadante de culturas de PBMC, quando comparados os níveis de secreção em culturas infectadas pelo DV com o Mock (Figura 4.9). A citocina secretada em maior concentração pelas PBMCs infectadas foi a IL-10, tendo uma média 93,17 pg/mL (Figura 4.9A), seguida das concentrações de IFN- γ , 23,35 pg/mL (Figura 4.9B) e TNF- α , com 10,46 pg/mL (Figura 4.9C).

Apesar das diferenças significativas detectadas na produção das citocinas em culturas de PBMC infectadas pelo DV, os níveis secretados foram baixos. Desta forma, pode-se sugerir que a infecção pelo DV não é capaz de ativar os linfócitos humanos *ex vivo*. Para confirmar tal hipótese, níveis do marcador de ativação CD69 foram avaliados nas culturas de linfócitos totais infectados pelo DV.

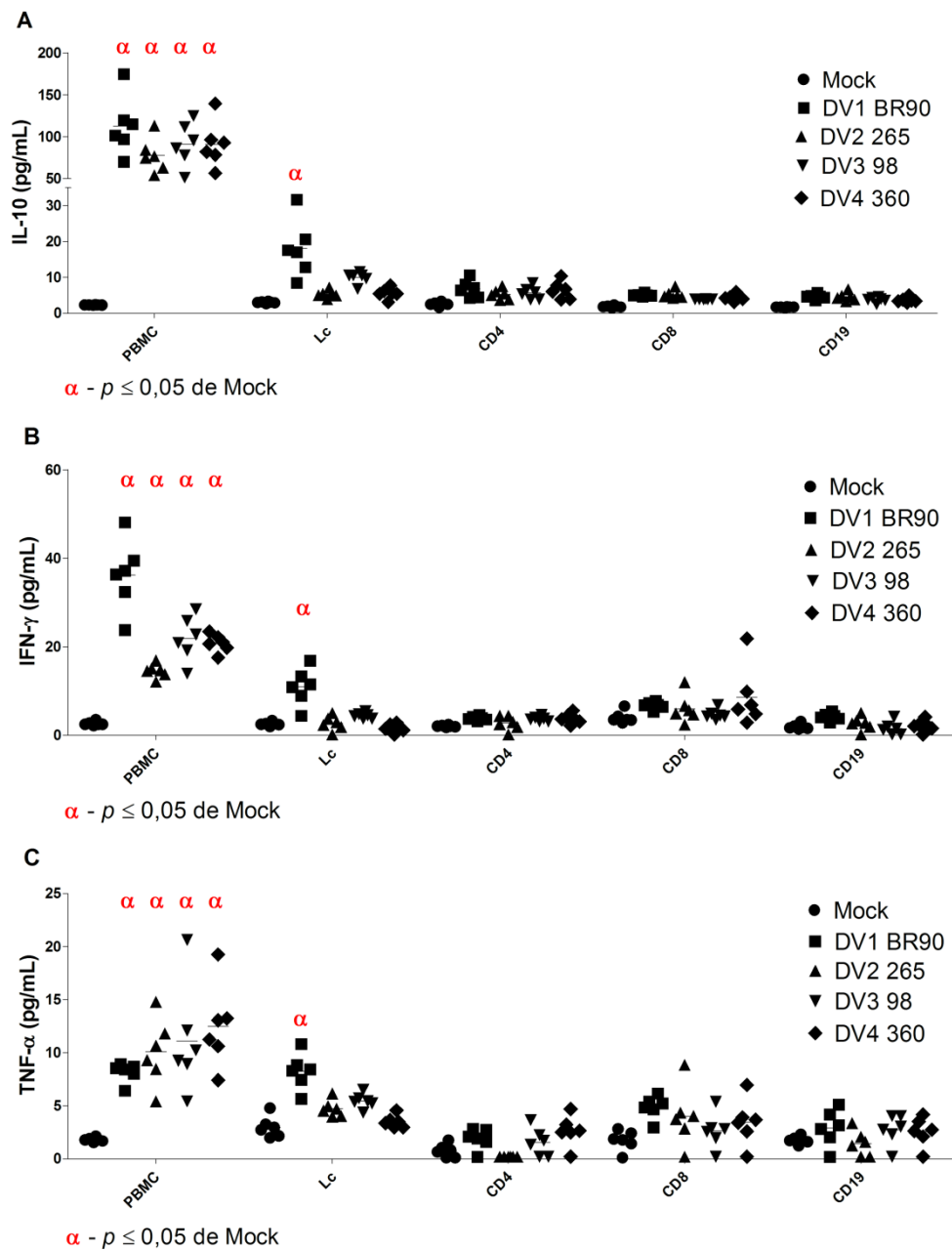


Figura 4.9 – A infecção pelo DV induz a produção de citocinas em culturas de PBMC. Concentrações de citocinas no sobrenadante de diferentes culturas de células humanas (PBMC; Lc – linfócitos totais; culturas enriquecidas para LT CD4⁺, LT CD8⁺ ou LB CD19⁺) provenientes de seis doadores diferentes, infectadas com cepas dos quatro sorotipos de DV. $\alpha = p \leq 0,05$ contra Mock.

4.3.2 A infecção dos linfócitos pelo DV induz baixos níveis de ativação celular

O marcador de superfície CD69 está presente em linfócitos ativados e participa da saída destas células dos linfonodos, após a apresentação de antígenos pelas APC. Para determinar se os DV poderiam induzir a ativação celular, culturas de linfócitos totais foram infectadas, e foram determinadas as porcentagens de infecção (4G2⁺) e de ativação celular (CD69⁺) nestas culturas. A análise dos resultados demonstrou um perfil de infecção semelhante aos obtidos nos experimentos anteriores (Figura 4.10A e C). Quando foram determinadas as porcentagens de células positivas para CD69⁺, não foram observadas diferenças significativas entre as células infectadas e o Mock (Figura 4.10B e D), sugerindo que estas células teriam níveis baixos de ativação após a infecção pelo DV. Adicionalmente, não foram observadas diferenças entre as cepas virais testadas.

Já foi anteriormente demonstrado que a ativação dos monócitos pelos IFN do tipo I poderia tornar essas células mais resistentes à infecção (Kurane e Ennis, 1987). Para determinar se a pré-ativação dos linfócitos poderia alterar a infecção dessas células pelo DV, culturas de linfócitos totais foram tratadas com ConA, e posteriormente infectadas. A análise dos resultados demonstrou que, de forma geral, o tratamento com ConA foi capaz de induzir a ativação celular (CD69⁺) (Figura 4.11B e D), especialmente nos LT CD4⁺ e LT CD8⁺.

Comparando-se as porcentagens de células infectadas na ausência (Figura 4.10A e C) ou na presença (Figura 4.11A e C) de ConA, demonstrou-se que ocorreu redução significativa na capacidade de infecção pelo DV após a ativação dos linfócitos. As análises indicaram uma redução média na porcentagem de infecção para os LT CD4⁺ de 4,4% para 1,4% (Figura 4.12A), já para os LT CD8⁺ a redução foi de 21,7% para 7,4% (Figura 4.12B), e para os LB CD19⁺ foi de 7,4% para 2,7% (Figura 4.12C).

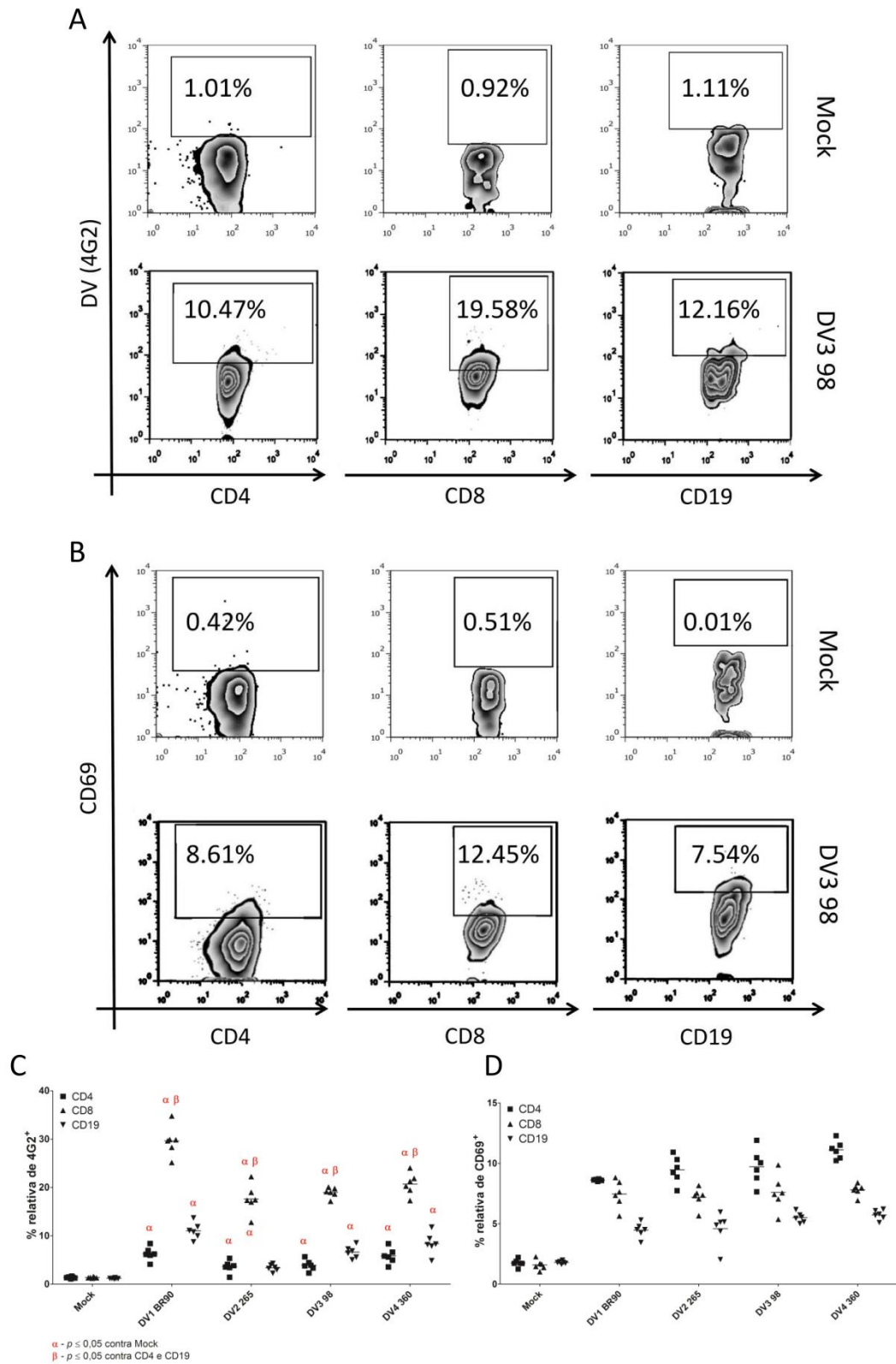


Figura 4.10 – A infecção de linfócitos totais pelo DV induz a baixos níveis de ativação celular. Determinação da ativação celular induzida pela infecção de linfócitos de doadores saudáveis por cepas dos quatro sorotipos do DV. Exemplo representativo de zebra de análise para a obtenção da porcentagem de células infectadas (A) e ativadas (B) em diferentes populações linfocitárias (LT CD4⁺, LT CD8⁺ e LB CD19⁺) infectadas por DV3 98 ou Mock. Médias das porcentagens de infecção (C) e ativação (D) em culturas de células de seis doadores distintos, infectadas pelos quatro sorotipos do DV. $\alpha = p \leq 0,05$ contra Mock e $\beta = p \leq 0,05$ contra CD4⁺ e CD19⁺.

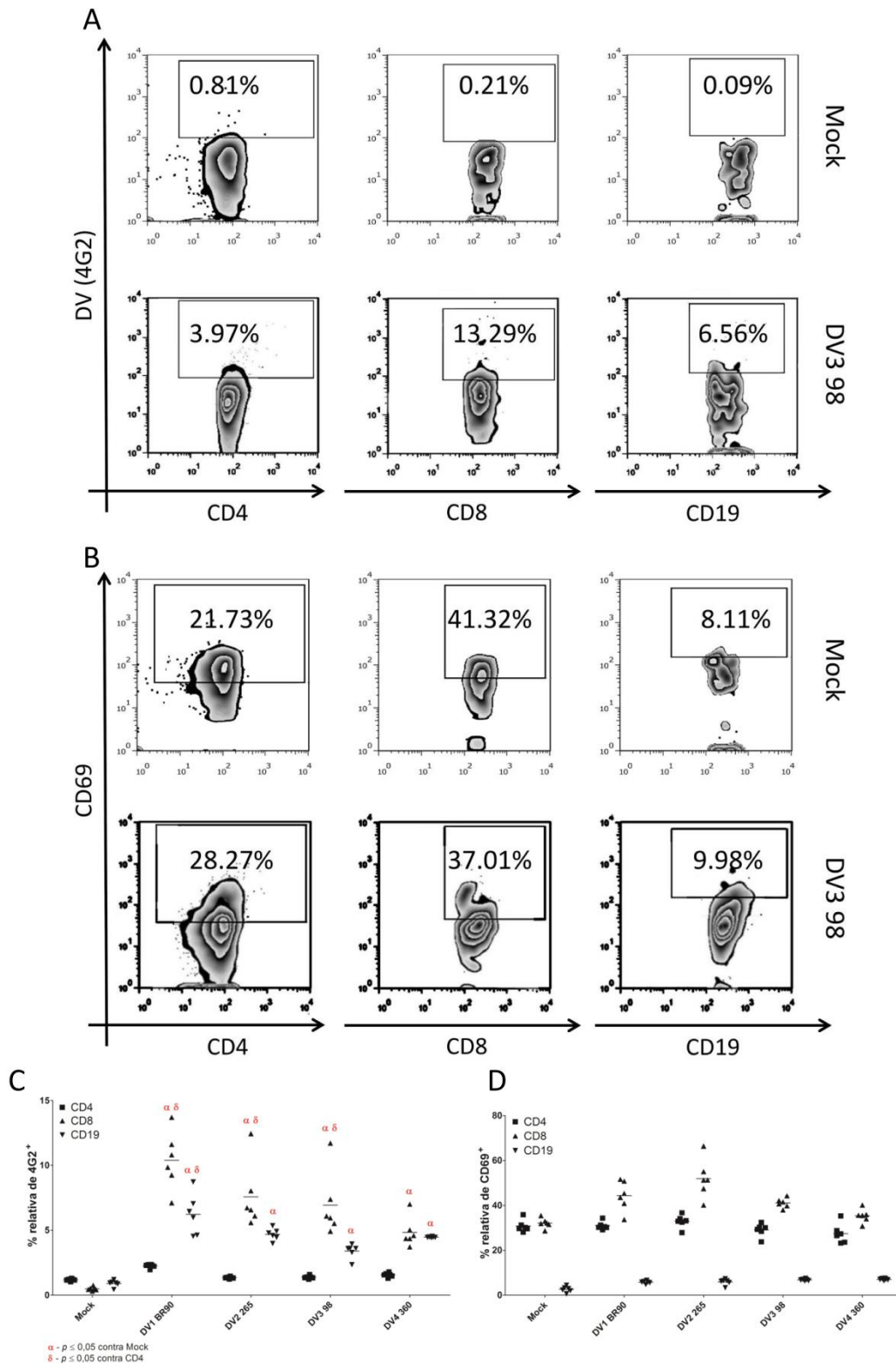


Figura 4.11 – A ativação de linfócitos por ConA diminui a susceptibilidade destas células pelo DV. Análise da porcentagem de linfócitos infectados por cepas dos quatro sorotipos do DV, após ativação induzida por tratamento com ConA. Exemplo representativo de zebra de análise para a obtenção da porcentagem de células infectadas (A) e ativadas (B) em diferentes populações linfocitárias (LT CD4⁺, LT CD8⁺ ou LB CD19⁺), previamente ativadas. Médias das porcentagens de infecção (C) e ativação (D) em culturas de células de seis doadores diferentes ativadas pelo tratamento com ConA e infectadas pelo DV. $\alpha = p \leq 0,05$ contra Mock e $\delta = p \leq 0,05$ contra CD4⁺.

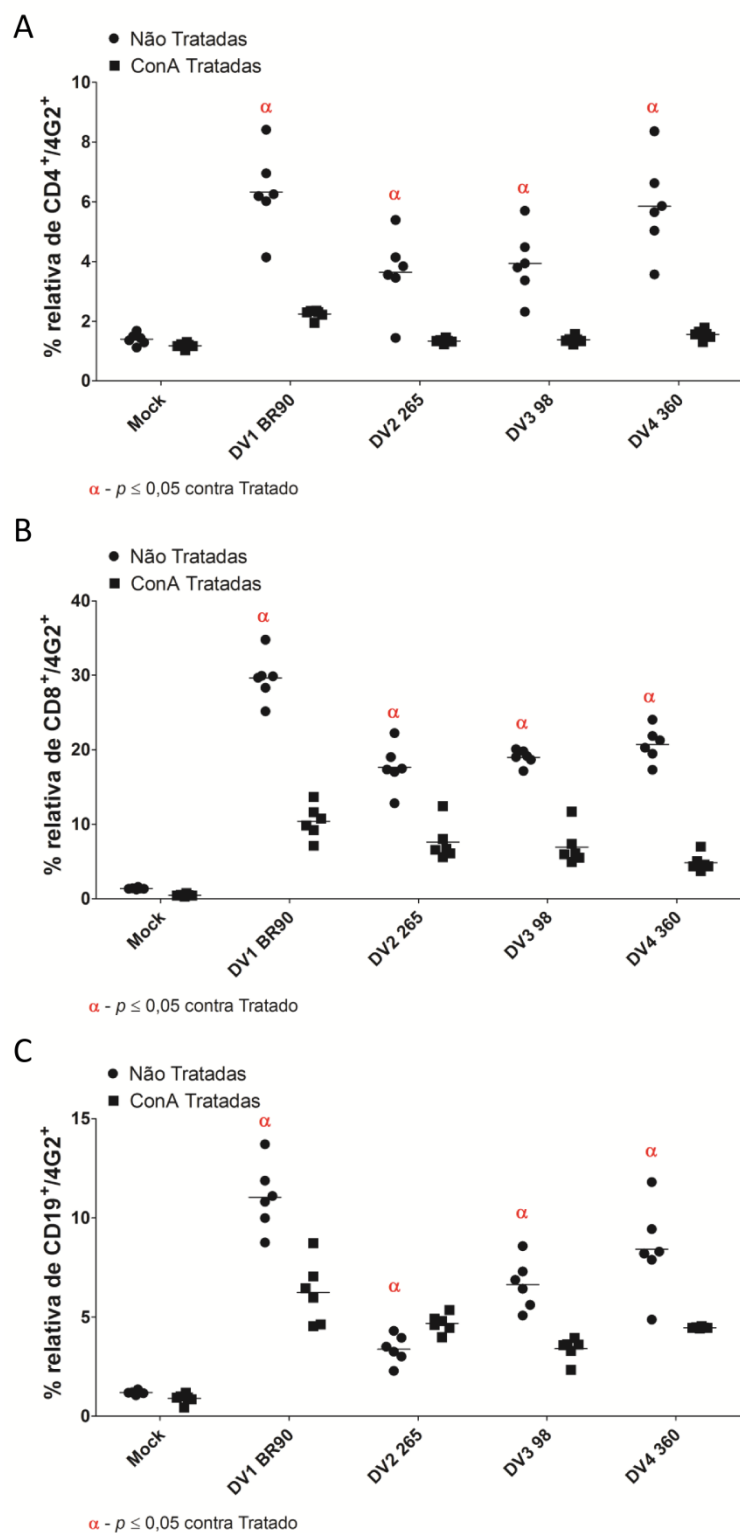


Figura 4.12 – Comparação entre as infecções de linfócitos totais tratados ou não com ConA para a susceptibilidade ao DV. Análise da porcentagem de linfócitos infectados por cepas dos quatro sorotipos de DV, pré (círculos) e pós ativação (quadrados) induzida por tratamento com ConA. Médias das porcentagens de infecção em culturas de seis doadores diferentes de LT CD4⁺ (A) LT CD8⁺ (B) e LB CD19⁺ (C), sem tratamento com ConA (círculos) e com tratamento com ConA (quadrados) e infectadas pelos DV. $\alpha = p \leq 0,05$ contra Tratadas com ConA.

A análise conjunta destes dados permite que seja traçada uma relação entre ativação e infecção celular. A infecção pelos DV não induziu porcentagens significativas de ativação celular. Por outro lado, a ativação prévia dos linfócitos levou a uma redução significativa na porcentagem de infecção. Porém, a condição de redução na infecção pela ativação celular poderia ser estritamente relacionada com o tratamento com a ConA. Para testar esta hipótese, outro agente de indução da ativação celular, a fitohemaglutinina (PHA), foi utilizada, e o ensaio anterior foi repetido (Figura 4.13). Uma vez que não ocorreram diferenças entre as cepas testadas no ensaio utilizando-se a ConA, o ensaio com o PHA foi realizado apenas com a cepa DV3 98. Nesta condição, a análise das células não tratadas com PHA apresentou o mesmo padrão de infecção e ativação anteriormente observado (Figura 4.13A e B). Quando as células foram tratadas com PHA e posteriormente foram analisadas as porcentagens de células infectadas e ativadas, foi possível observar que ocorreu uma redução significativa na porcentagem de infecção (Figura 4.13C) além de um aumento na ativação celular (Figura 4.13D). Estes dados confirmam os anteriores, reforçando a hipótese de que a ativação dos linfócitos poderia diminuir a susceptibilidade ao DV.

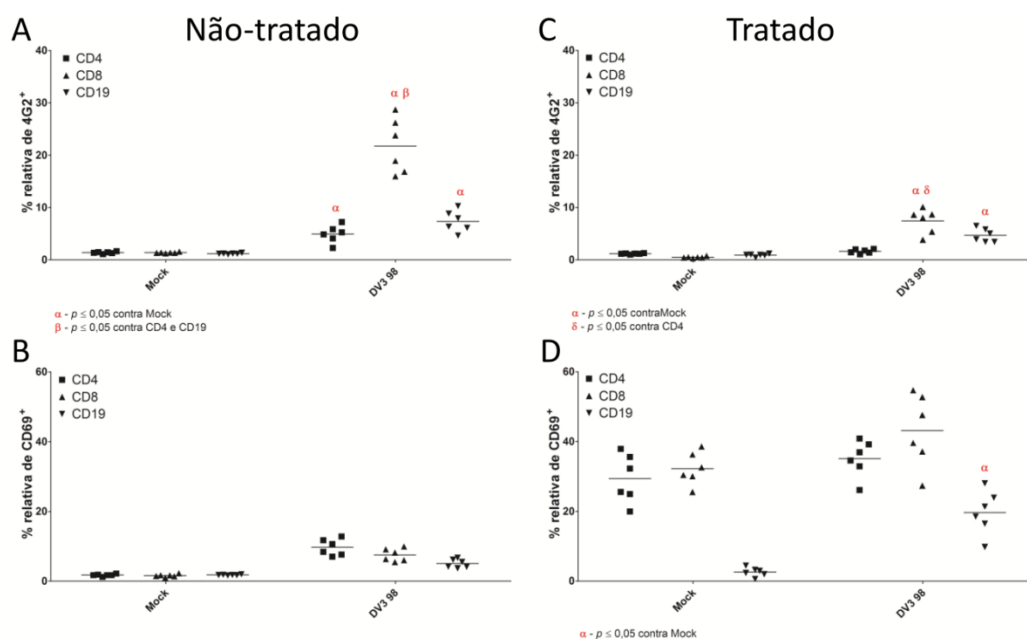


Figura 4.13 – Ativação e infecção de linfócitos tratados ou não tratados com PHA e infectados por DV. Médias das porcentagens de infecção em culturas de linfócitos de seis doadores distintos infectados pelo DV3 98 em cada uma das populações isoladas e não tratadas (A) ou tratadas com PHA (C). Porcentagem de ativação dos linfócitos totais induzida pelo DV3 98 e não tratadas (B) ou tratadas com PHA e posteriormente infectadas (D). $\alpha = p \leq 0,05$ contra Mock, $\beta = p \leq 0,05$ contra CD4⁺ e CD19⁺ e $\delta = p \leq 0,05$ contra CD4⁺.

Portanto, a infecção dos linfócitos totais não foi capaz de induzir a ativação celular de maneira significativa. No intuito de verificar se os baixos níveis de ativação celular observada em linfócitos totais teria relação com a morte celular, foram realizados ensaios para determinar a sobrevivência destas células infectadas por DV.

4.3.3 A infecção pelo DV não induz linfócitos humanos à morte

Já foi documentado que linfócitos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Razvi e Welsh, 1993; Alfonzo *et al.*, 2008), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), vírus da hepatite B (HBV) ou C (HCV) (Zhukova *et al.*, 2007) são induzidos à morte celular. No intuito de determinar se a infecção pelo DV poderia correlacionar-se à morte de linfócitos, PBMCs foram infectadas com DV, sendo posteriormente analisados os marcadores de morte celular Anexina V, a qual se liga a fosfatidilserina, o 7-AAD, intercalante de DNA, e o reagente FLICA, marcador de caspases ativadas.

A análise das marcações demonstrou que os monócitos contidos no PBMC apresentaram média de 15,95% de morte celular, mesmo na ausência de infecção (Mock; Figura 4.14A e B superior). Já na presença de DV, uma porcentagem maior de células monocíticas (média de 30,52%) foi positiva para os marcadores de morte (DV3 98; Figura 4.14A e B superior). Quando os linfócitos totais presentes na mesma cultura foram analisados para os três marcadores de morte celular, foi possível observar que estas células possuíam menores porcentagens de marcação, seja na ausência (Mock, média de 3,38%) ou na presença do DV (DV3 98, média de 2,97%) (Figura 4.14A e B inferior). Os dados revelam ainda o mesmo padrão de infecção anteriormente observado (Figura 4.14C).

No intuito de determinar se ocorreu uma relação estatística entre morte celular e infecção, os valores obtidos em ambas as dosagens foram normalizados pela porcentagem de aumento em relação ao Mock, e foram comparados pela correlação de Pearson. Desta forma, para os monócitos humanos, não foi encontrada diferença significativa entre morte celular e porcentagem de infecção (Figura 4.14D e E). Já para a população de linfócitos na mesma cultura de PBMC, foram observadas diferenças significativas entre as porcentagens de morte celular e infecção,

sugerindo que os linfócitos infectados não foram induzidos à morte pela infecção por DV (Figura 4.14D e E).

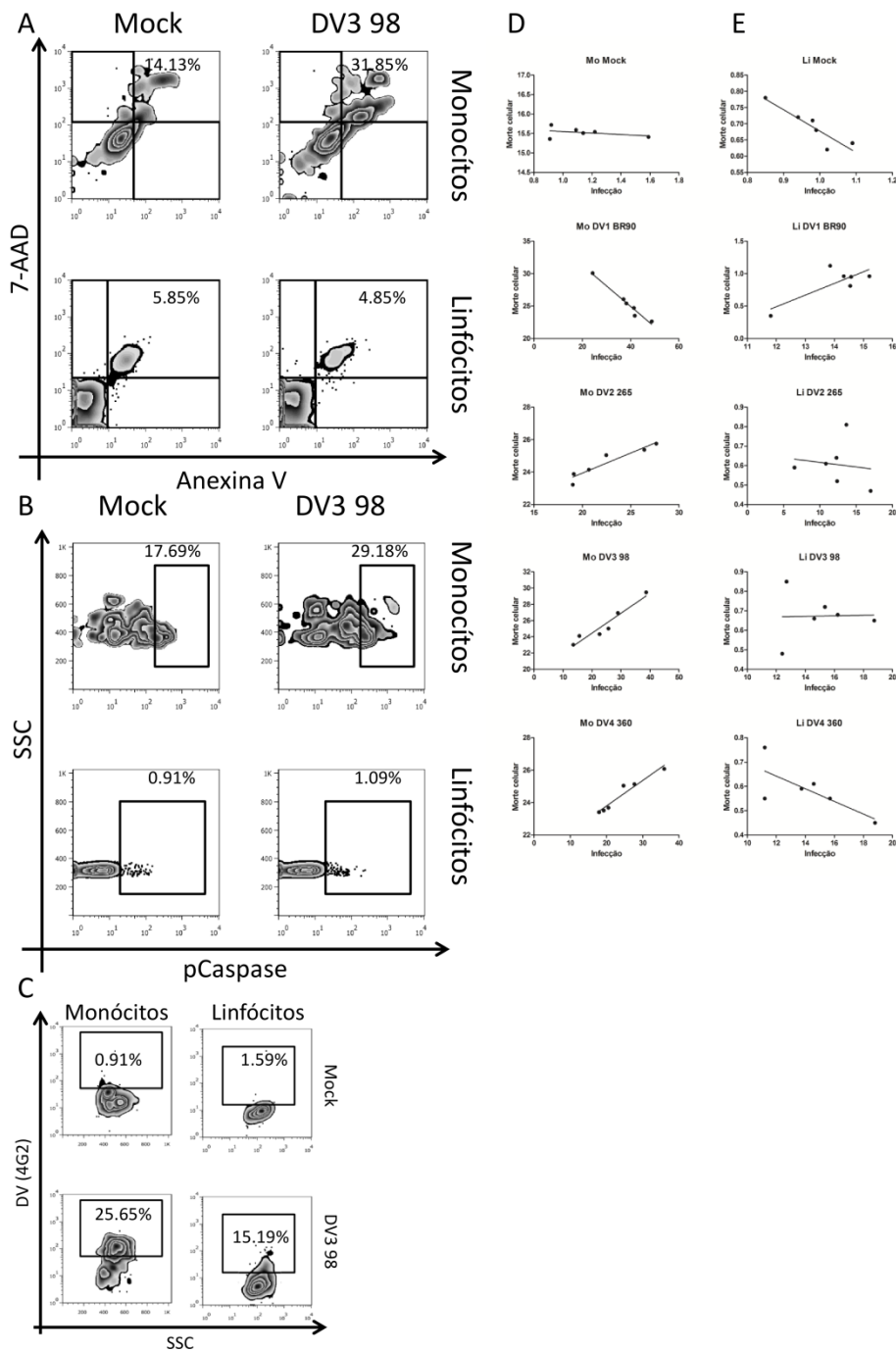


Figura 4.14 – Ocorre a morte de monócitos mas não linfócitos após infecção pelo DV. Correlação entre as porcentagens de morte celular e infecção em monócitos e linfócitos humanos. Exemplo representativo de zebra de análise para a obtenção da porcentagem de monócitos e linfócitos positivos para Anexina V e 7-AAD (A) ou poli-Caspases ativadas (B) infectados por DV3 98 ou Mock. Gráficos de comparação entre a porcentagem de células infectadas pelos DV (“box”) e a porcentagem de morte celular (“points”). Médias relativas ao aumento em Mock das determinações da morte celular foram obtidas pela marcação com Anexina V⁺ e 7-AAD⁺ e poli-caspases⁺ ativadas, em monócitos (D) ou linfócitos (E), infectados pelo DV dos quatro sorotipos. Correlação análise Perarson. (E) Exemplo representativo de zebra de análise para a obtenção da porcentagem de infecção em monócitos e linfócitos. $\alpha = p \leq 0,05$ contra Mock, $\epsilon = p \leq 0,05$ para a comparação entre a infecção e a morte celular.

As análises dos resultados obtidos demonstraram que os linfócitos humanos não são induzidos a níveis significativos de ativação (produção de citocinas e expressão de CD69) ou à morte celular (Anexina V, 7-AAD e FLICA) após infecção pelo DV. Em continuidade ao estudo de caracterização da infecção, foram realizados ensaios para determinar se a presença do DV poderia influenciar na indução de proliferação de linfócitos pela apresentação de antígenos.

4.3.4 A proliferação celular no EML não é reduzida após infecção pelo DV

No ensaio misto de leucócitos (EML) é analisada a capacidade de proliferação de linfócitos, após a apresentação de antígenos “non-self” via HLA, realizada por APCs alogênicas (Steinman e Witmer, 1978). No intuito de determinar se o DV seria capaz de influenciar a resposta proliferativa induzida no EML, linfócitos totais foram infectados por cepas dos quatro sorotipos de DV. Após 5 dias de incubação, estas células foram co-cultivadas com imdDCs de doadores distintos (alogênicas), sendo a proliferação celular avaliada pelo MFI de CFSE, após 5 dias de co-cultivo, (M&M – Diagrama 3.4). A análise dos dados demonstrou índices de proliferação, mesmo na ausência dos DV (Mock, média do MFI de 755), o que confirma a eficácia do EML (Figura 4.15A e B – Mock). Valores de proliferação semelhantes foram também obtidos nas culturas previamente infectadas pelos DV1 BR90, DV2 265 DV3 98 (Figura 4.15A e B – DV). Porém, quando a análise foi realizada em células infectadas pelo DV4 360 (média do MFI de 502), foi possível detectar uma redução discreta, porém significativa no MFI referente à proliferação celular (Figura 4.15B). Adicionalmente, na presença de imdDCs autólogas, a proliferação dos linfócitos totais infectados pelo DV foi avaliada e não se observou proliferação celular (Figura 4.15C). Já as infecções dos linfócitos totais seguiram os mesmos níveis anteriormente obtidos (Figura 4.15E e F). O controle de diferenciação das imdDCs também foi considerado satisfatório (Figura 4.15D).

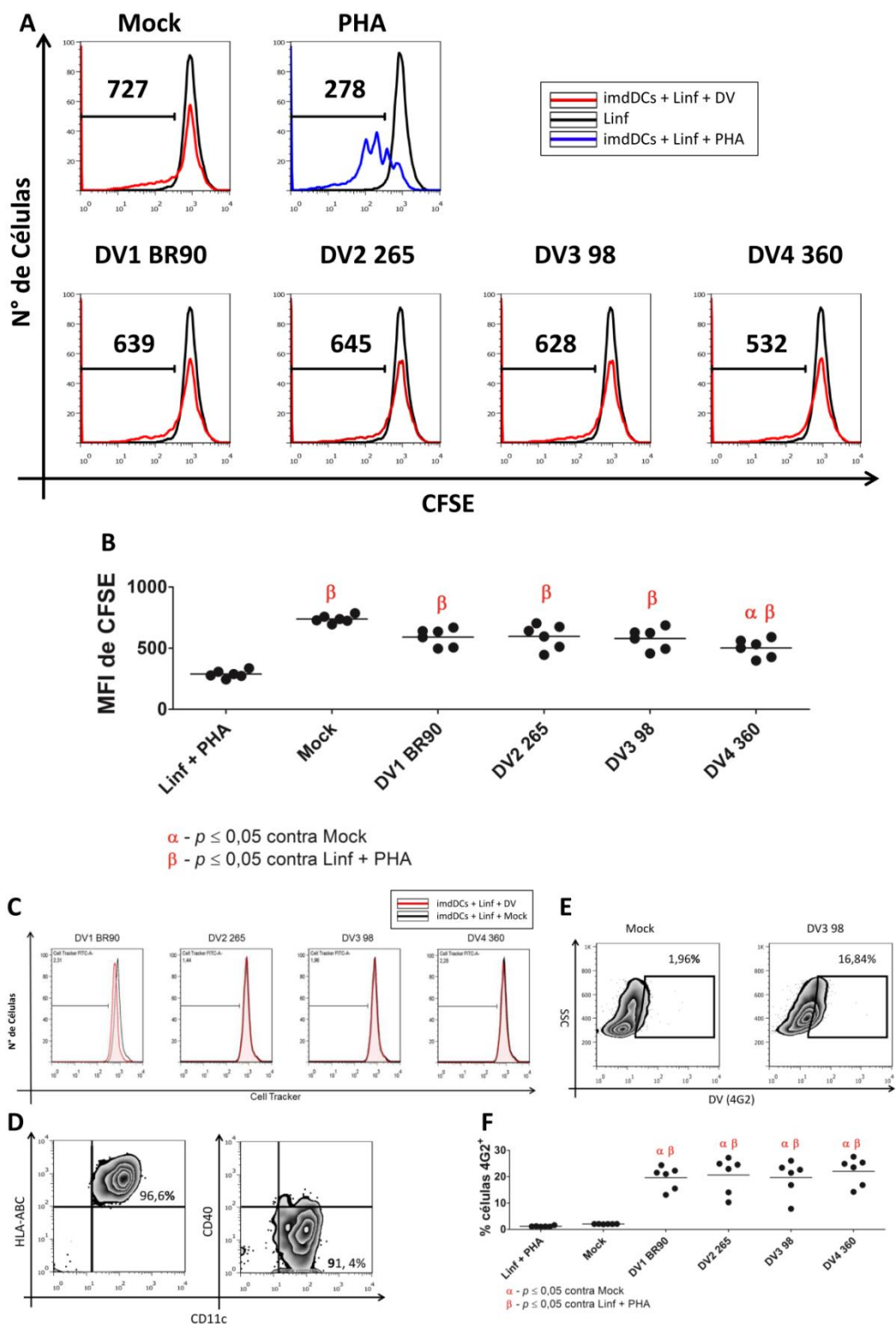


Figura 4.15 – A infecção pelo DV não modula negativamente a proliferação dos linfócitos no EML. Ensaio misto de leucócitos na presença de cepas dos quatro sorotipos de DV. (A) Exemplo representativo de histogramas de análise para a obtenção da intensidade média de fluorescência (MFI) de linfócitos marcados com CFSE. Em azul histograma de células induzidas a proliferação por PHA (controle positivo de proliferação), em vermelho, proliferação induzida pelo EML (alógenicas), na presença ou ausência (Mock) de DV, em preto controle de células não proliferativas. (B) Valores de MFI em seis culturas distintas em diferentes condições de cultivo. (C) Controle de proliferação induzida diretamente pelo DV, com a presença de imdDCs autólogas. (D) Exemplo representativo de imunofenotipagem das imdDCs utilizadas no EML. (E) Exemplo representativo (F) e média da porcentagem de infecção dos linfócitos totais pelo DV, previamente ao EML. $\alpha = p \leq 0,05$ contra Mock, $\beta = p \leq 0,05$ contra PHA.

Buscando a continuidade da avaliação da influência do DV em ensaios de proliferação celular, foi realizado o ensaio de “prime” de linfócitos.

4.3.5 A proliferação celular no EPL não é reduzida após infecção pelo DV

A capacidade de resposta de linfócitos de memória dirigida a antígenos de patógenos é um dos fundamentos dos protocolos de vacinação (Ye *et al.*, 2013). Os linfócitos de memória provenientes de doadores vacinados, e que tenham alta afinidade por epítomos do YF 17DD (vírus vacinal da febre amarela), podem ser induzidos à expansão clonal. Esta expansão pode ser induzida *in vitro*, com a ação de uma APC como as DC, durante a apresentação de antígenos virais específicos via HLA. Utilizando-se deste conceito, o EPL realizado neste trabalho objetiva proporcionar a interação APC-linfócitos de memória para YF 17DD. Esta interação foi realizada utilizando-se linfócitos totais infectados pelo DV, avaliando a interferência do vírus na proliferação celular (M&M – Diagrama 3.5).

No EPL realizado, o controle negativo de proliferação, nas culturas que não tiveram contato com o vírus YF 17DD a proliferação celular foi bastante discreta, com um MFI médio de 1334 (Figura 4.16A e B). Já quando foram analisadas as condições de infecção pelo DV, foi possível observar valores médios para o MFI de 754 no Mock e 764 nas infecções por DV1 BR90, DV2 265 e DV3 98 (Figura 4.16A e B). Já a média do MFI nos linfócitos infectados pelo DV4 360 foi de 424, significativamente menor em relação ao Mock (Figura 4.16A e B). Como controle deste experimento, foi determinada a porcentagem de infecção, onde foi possível demonstrar o mesmo padrão anteriormente observado (Figura 4.16C e D).

Com estes resultados demonstrou-se que o DV não teria influência sobre a proliferação de linfócitos totais após o estímulo com EPL, com exceção do DV4 360, que pareceu exacerbar a proliferação celular.

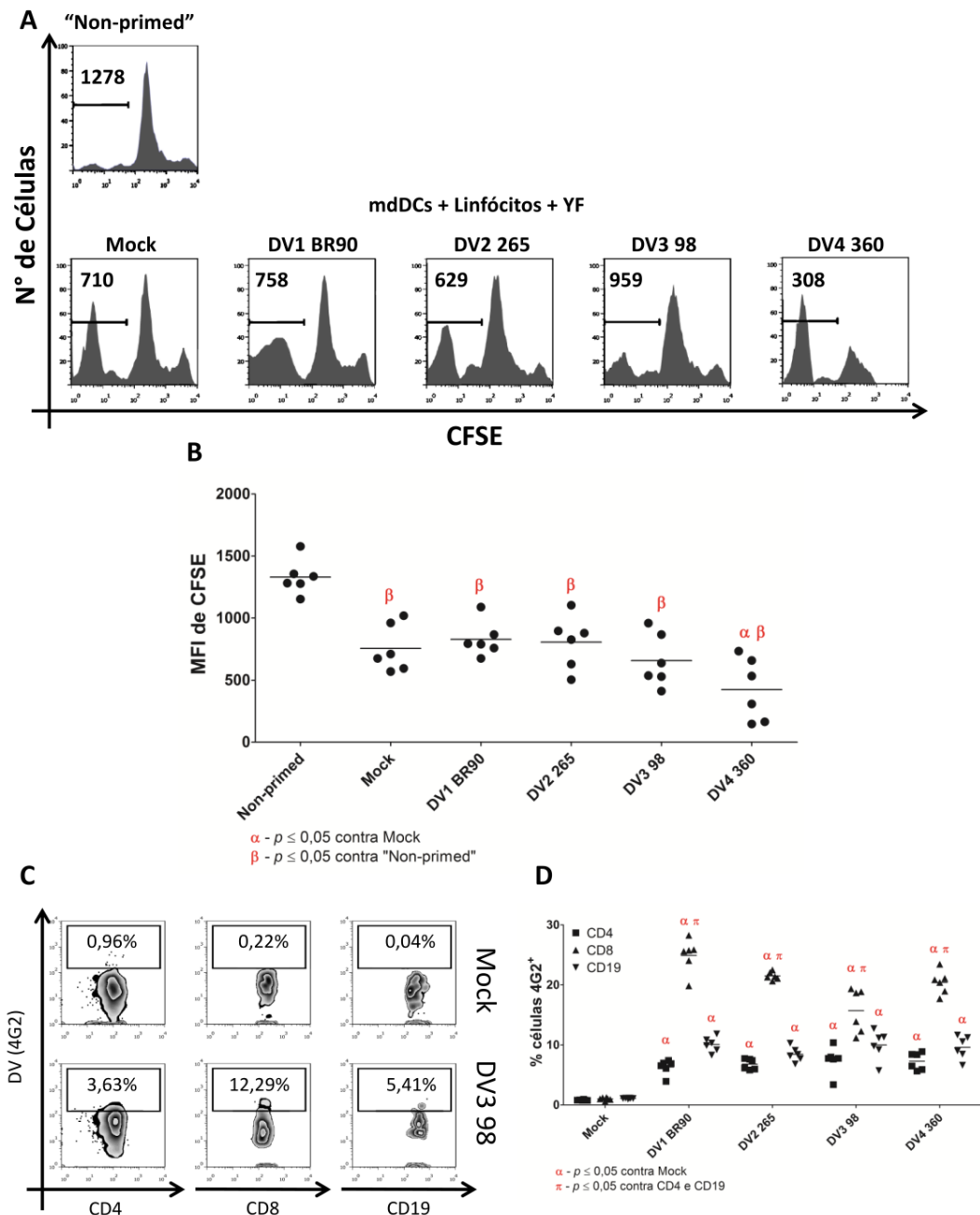


Figura 4.16 – A infecção dos linfócitos pelo DV não modula negativamente a proliferação celular no ensaio de “prime” de linfócitos. Ensaio de “prime” de linfócitos (EPL) na presença de cepas dos quatro sorotipos do DV. (A) Exemplo representativo de histogramas para a análise e obtenção da intensidade média de fluorescência (MFI) de linfócitos marcados com CFSE. No histograma superior, células não estimuladas com YF 17DD (controle negativo de proliferação), nos histogramas inferiores, proliferação induzida pelo EPL, na presença (DV) ou ausência (Mock) dos vírus. (B) Valores de MFI de proliferação em seis culturas distintas em diferentes condições de cultivo. Exemplo representativo (C) e porcentagem média de infecção (D) dos linfócitos antes do EPL. α = $p \leq 0,05$ contra Mock, β = $p \leq 0,05$ contra Não tratado e π = $p \leq 0,05$ contra CD4⁺ e CD19⁺.

Prosseguindo o estudo de caracterização da infecção, foram realizados ensaios para determinar se os DV poderiam induzir a degranulação de LT CD8⁺ e a secreção de granzimas e perforinas.

4.3.6 Degranulação de Linfócitos T CD8⁺ e secreção de granzima e perforina em culturas de linfócitos totais infectados pelo DV

Os mediadores granzima e perforina são marcadores da função de citotoxicidade em células T CD8⁺, sendo secretados no momento da degranulação. Durante a secreção destes mediadores, LT CD8⁺ expõem na superfície o marcador CD107a (LAMP-1), o qual pode ser utilizado como marcador da função citotóxica de degranulação. No intuito de determinar se as células infectadas pelo DV seriam capazes de induzir a degranulação dos LT CD8⁺, culturas de linfócitos totais foram infectadas e a porcentagem para os marcadores CD8⁺/CD107a⁺ foi determinada. A análise deste parâmetro demonstrou que não houve diferença significativa entre as células infectadas e o Mock (Figura 4.17A e B) sugerindo ausência de degranulação dos LT CD8⁺. Porém, quando as concentrações de perforina (Figura 4.17C esquerda) e granzima (Figura 4.17D esquerda) foram determinadas no sobrenadante das mesmas culturas, foi possível observar que a infecção pelo DV induziu a secreção destes mediadores. Estes resultados sugerem que outras células presentes na cultura, como a NK, podem ser as responsáveis pela secreção de mediadores de citotoxicidade.

Adicionalmente, buscando analisar se a infecção por DV seria capaz de reduzir a função de degranulação dos linfócitos, as culturas infectadas foram tratadas com PHA. Ao determinar-se a porcentagem de LT CD8⁺/CD107a⁺, demonstrou-se que o tratamento com PHA induziu um aumento significativo de degranulação (Figura 4.17A inferior e B direita), quando comparado com as células não tratadas (Figura 4.17A superior e B esquerda). Esta diferença persistiu mesmo nas culturas que foram infectadas pelos DV e posteriormente tratadas com PHA, sugerindo que não ocorreu regulação desta função pela presença do vírus (Figura 4.17A e B).

Foram também analisados os níveis de produção de granzima e perforina no sobrenadante das culturas de células infectadas com os DV e tratadas com PHA. Nesta condição, foi novamente observado um aumento significativo nos níveis dos mediadores, quando se comparou células tratadas com PHA (Figura 4.17C e D direita) e não tratadas (Figura 4.17C e D esquerda). Esta condição foi mantida na ausência (Mock) ou na presença do DV (infectadas), confirmando os dados

anteriores onde à infecção pelo DV não foi capaz de regular a resposta funcional de degranulação.

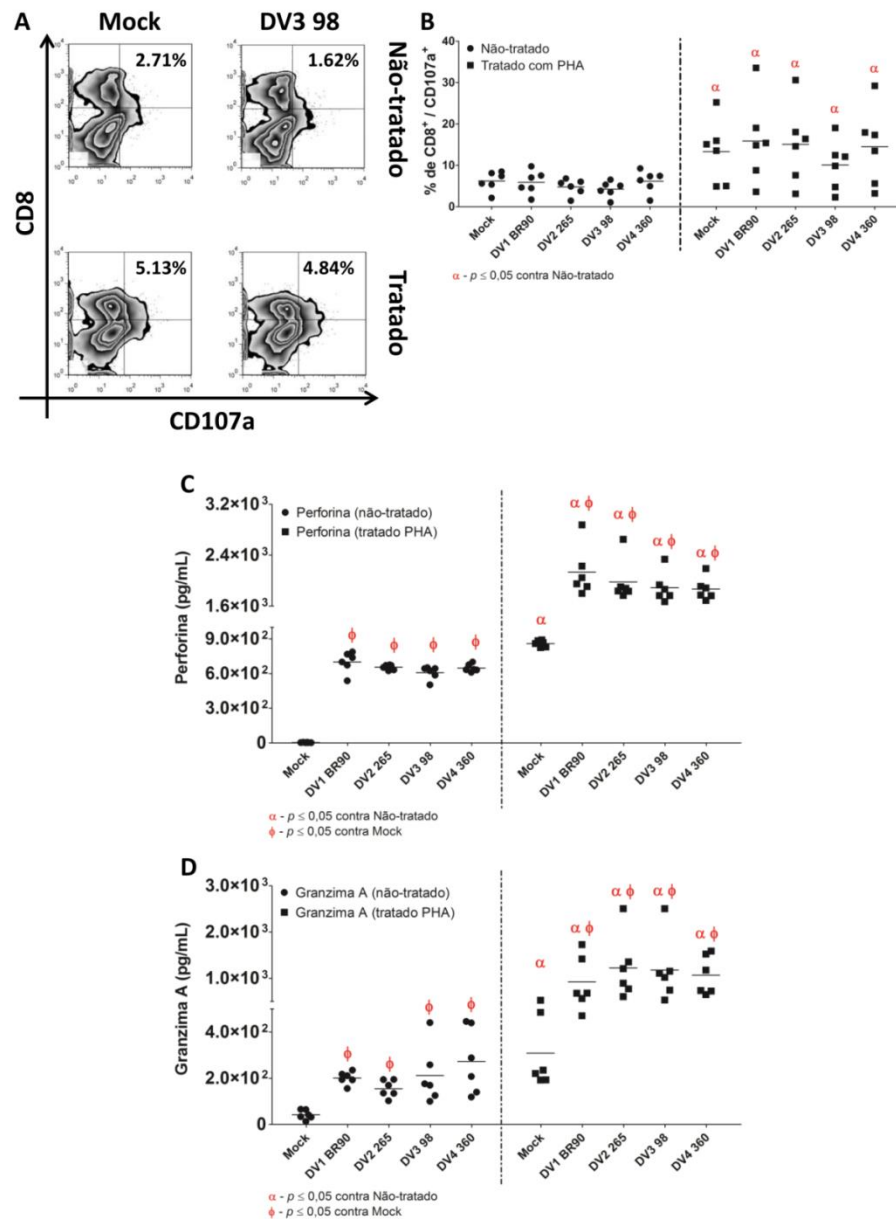


Figura 4.17 – Não ocorre degranulação de linfócitos T CD8⁺ na infecção de linfócitos totais pelo DV. Ensaio de degranulação de LT CD8⁺ e determinação de perforina e granzima no sobrenadante de culturas de linfócitos totais. (A) Exemplo representativo de zebra de análise para porcentagem de células positivas para CD8 e CD107a, após a infecção por Mock (esquerda) ou pelo DV3 98 (direita), em células sem tratamento com PHA (superior) e com tratamento com PHA (inferior). (B) Médias das porcentagens em seis culturas de células positivas para CD8⁺/CD107a⁺, na ausência (Mock) ou presença dos DV (infectadas), em células sem tratamento após a infecção (direita) e com tratamento de PHA após a infecção (esquerda). Níveis de perforina (C) e granzima (D) secretados no sobrenadante de culturas de linfócitos após infecção pelos quatro sorotipos de DV, em células sem tratamento após a infecção (direita) e com tratamento de PHA após a infecção (esquerda). ϕ = $p \leq 0,05$ contra Mock, α = $p \leq 0,05$ contra não-tratadas na mesma condição de infecção.

As análises destes resultados sugerem que não ocorreu regulação da resposta funcional (proliferação e degranulação de LT DC8⁺) em células infectadas por DV. Buscando a continuidade da caracterização funcional de linfócitos infectados pelo DV, foram determinadas respostas específicas a cada população celular isoladamente.

4.4 Respostas específicas dos linfócitos induzidas pelo DV

As análises das respostas específicas a cada uma das populações de linfócitos estudadas visaram determinar as funções que teriam relação com as hipóteses propostas para explicar os casos de dengue com complicações. O procedimento de “cell-sorting” foi realizado visando à obtenção de culturas enriquecidas de linfócitos, onde LT CD3⁺/CD8⁺/CD45RA⁺, LT CD3⁺/CD8⁺/CD45RO⁺, LT CD3⁺/CD4⁺ e LB CD3⁻/CD19⁺, foram isolados (pureza superior a 93%; Figura 4.18). Nestas culturas, após a infecção pelo DV, foi determinada a susceptibilidade dos LT CD8⁺ de memória ou “naïve”, a polarização Th dos LT CD4⁺ e a produção de anticorpos por LB CD19⁺.

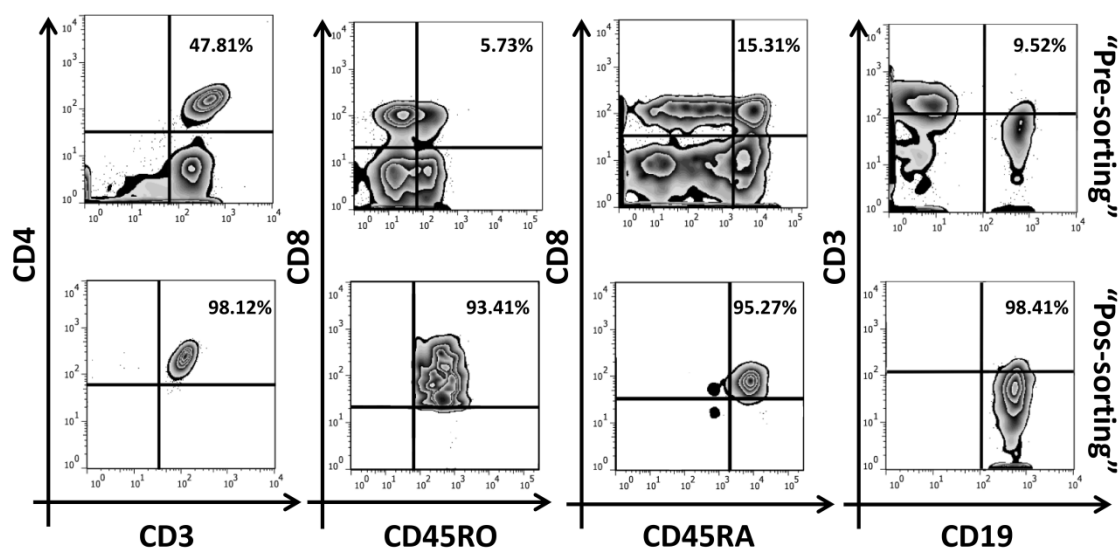


Figura 4.18 – Enriquecimento de diferentes populações linfocitárias por “cell-sorting”. Exemplo representativo de zebra com estratégia de “sorting” para a obtenção culturas enriquecidas em linfócitos T auxiliares (CD3⁺/CD4⁺), linfócitos T citotóxicos “naïve” (CD3⁺/CD8⁺/CD45RA⁺), linfócitos T citotóxicos de memória (CD3⁺/CD8⁺/CD45RO⁺) e linfócitos B (CD3⁻/CD19⁺).

4.4.1 DV infecta linfócitos T CD8⁺ de memória ou “naïve” de forma não-seletiva, não induzindo a produção de granzima

Um aspecto envolvido na patogênese da dengue é a resposta de células CD8⁺ de memória contra infecções com um sorotipo viral heterólogo, onde estas células podem induzir um quadro de inflamação, porém com baixa eficácia na eliminação de células infectadas (Mongkolsapaya *et al.*, 2003; Mongkolsapaya *et al.*, 2006). A fim de se examinar a resposta destas células às cepas dos quatro sorotipos de DV, foi determinada inicialmente a susceptibilidade de linfócitos T CD3⁺/CD8⁺/CD45RA⁺ (“naïve”), e de linfócitos T CD3⁺/CD8⁺/CD45RO⁺ (memória). Como controle deste experimento, foram usadas culturas enriquecidas para células T CD3⁺/CD8⁺ (totais).

As porcentagens de infecção média para as três diferentes culturas (Figura 4.19) apresentaram diferenças significativas em relação ao Mock (1,07% de infecção). A comparação das porcentagens de infecções dos LT CD8⁺ totais (14,52% de infecção) com os LT CD8⁺ “naïve” (15,78% de infecção) ou com os LT CD8⁺ de memória (14,01% de infecção), mostrou que estas células seriam igualmente suscetíveis ao DV (Figura 4.19B, C e D – direita). Foram também quantificados os níveis de granzima nos sobrenadantes das diferentes culturas, o que permitiu determinar que não ocorreu níveis significativos de secreção deste mediador em nenhuma das condições de infecção testadas (Figura 4.19B, C e D – esquerda).

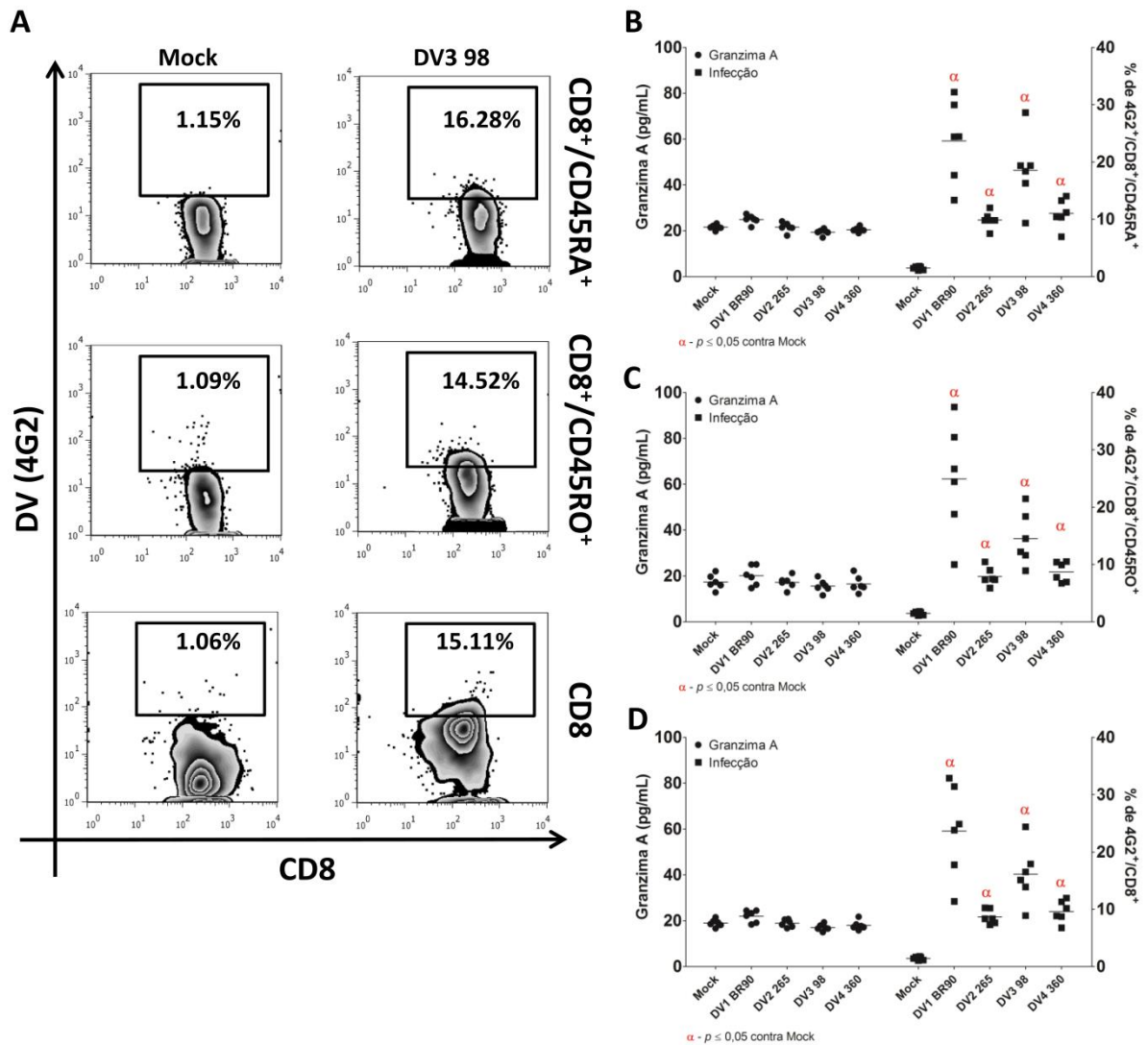


Figura 4.19 – Os linfócitos T CD8⁺ “naïve” ou de memória possuem a mesma susceptibilidade ao DV. (A) Exemplo representativo de zebra de análise para porcentagem de infecção em culturas enriquecidas em linfócitos T citotóxicos “naïve” (CD3⁺/CD8⁺/CD45RA⁺), de memória (CD3⁺/CD8⁺/CD45RO⁺) ou linfócitos T citotóxicos totais (CD3⁺/CD8⁺), após a infecção por Mock (esquerda) ou pelo DV3 98 (direita). (B) Médias das porcentagens de infecção (direita) e níveis de granzima (esquerda) em culturas de linfócitos T CD8⁺ “naïve” (B), linfócitos T CD8⁺ de memória (C) e linfócitos T CD8⁺ totais (D) de seis doadores distintos na presença de cepas dos quatro sorotipos do DV. $\alpha = p \leq 0,05$ contra Mock.

4.4.2 A infecção pelo DV induz a polarização ao perfil Th2

Após a infecção do hospedeiro pelo DV, uma das populações de células que modulam a resposta imunológica é a dos LT CD4⁺. Uma das principais formas de resposta aos patógenos perpetrada por estas células pode ser caracterizada por polarizar a resposta para um perfil Th1, Th2 ou Th17. Adicionalmente, por razões ainda não totalmente esclarecidas, pacientes que desenvolvem um perfil de resposta Th2 teriam maior propensão ao desenvolvimento de quadros de dengue com complicações (Chaturvedi *et al.*, 1999; Azeredo *et al.*, 2001).

Neste panorama, a análise dos resultados demonstrou que as culturas enriquecidas em LT CD4⁺ infectadas pelo DV não induziram a polarização Th1 (Figura 4.20A e B), Th2 (Figura 4.21) ou Th17 (Figura 4.22). Nas culturas de PBMC infectadas pelos DV, não foram encontradas porcentagens significativas para a polarização Th1 (Figura 4.20A e B) ou Th17 (Figura 4.22). Já as análises do perfil Th2 em PBMC infectadas pelos DV3 98 (10,21%) e DV4 360 (19,56%) mostraram diferenças significativas em relação ao Mock (7,66%) (Figura 4.21). Nesta mesma análise, não foram observadas diferenças significativas entre Mock e as células infectadas pelos DV1 BR90 (7,75%) ou DV2 265 (8,28%) (Figura 4.21). Foi também interessante observar nas marcações para perfil Th1 (Figura 4.20A e B) e Th17 (Figura 4.22), das culturas de PBMC na presença do DV, uma população celular CD4⁻/IFN- γ ⁺ e CD4⁻/IL-17A⁺ respectivamente, as quais podem estar relacionadas com a presença dos LT CD8⁺ nestas culturas. As análises das porcentagens de infecção foram concordantes com os dados anteriormente obtidos (Figura 4.20C e D).

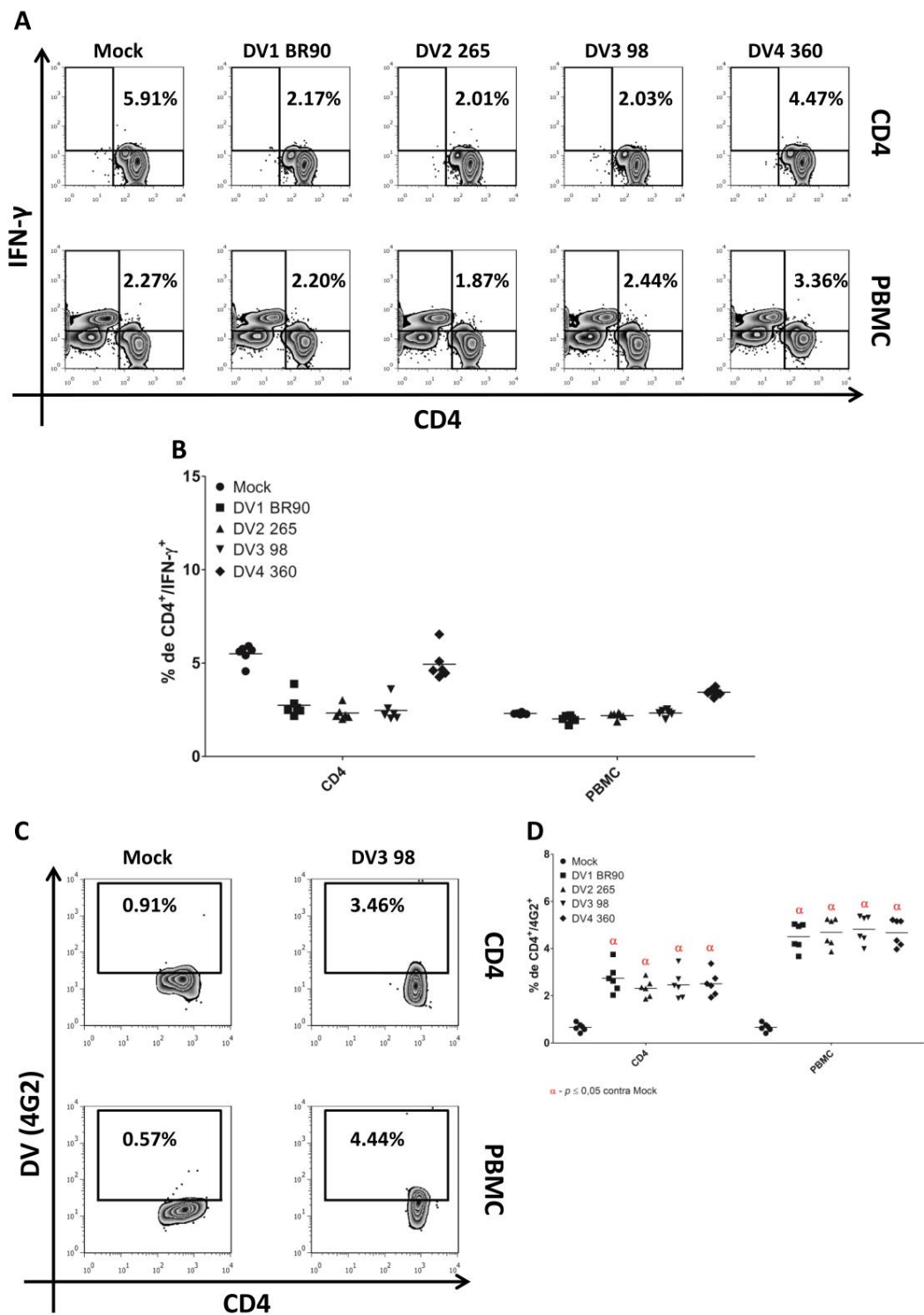


Figura 4.20 – Não ocorre polarização Th1 após a infecção de linfócitos humanos pelo DV. Determinação da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ positivos para marcação intracelular de interferon gama (IFN- γ), na infecção pelo DV. (A) Exemplo representativo de zebra de análise para porcentagem de células positivas para CD4⁺/IFN- γ ⁺ (polarização Th1), após a infecção por Mock ou DV, em culturas de enriquecidas por “cell-sorting” para linfócitos T CD4⁺ (superior) ou em culturas de PBMC (inferior). (B) Médias das porcentagens em culturas de células CD4⁺/IFN- γ ⁺ de seis doadores diferentes presentes nas culturas enriquecidas para linfócitos T CD4⁺ (esquerda) ou em culturas de PBMC (direita), infectadas pelos DV. $\alpha = p \leq 0,05$ contra Mock.

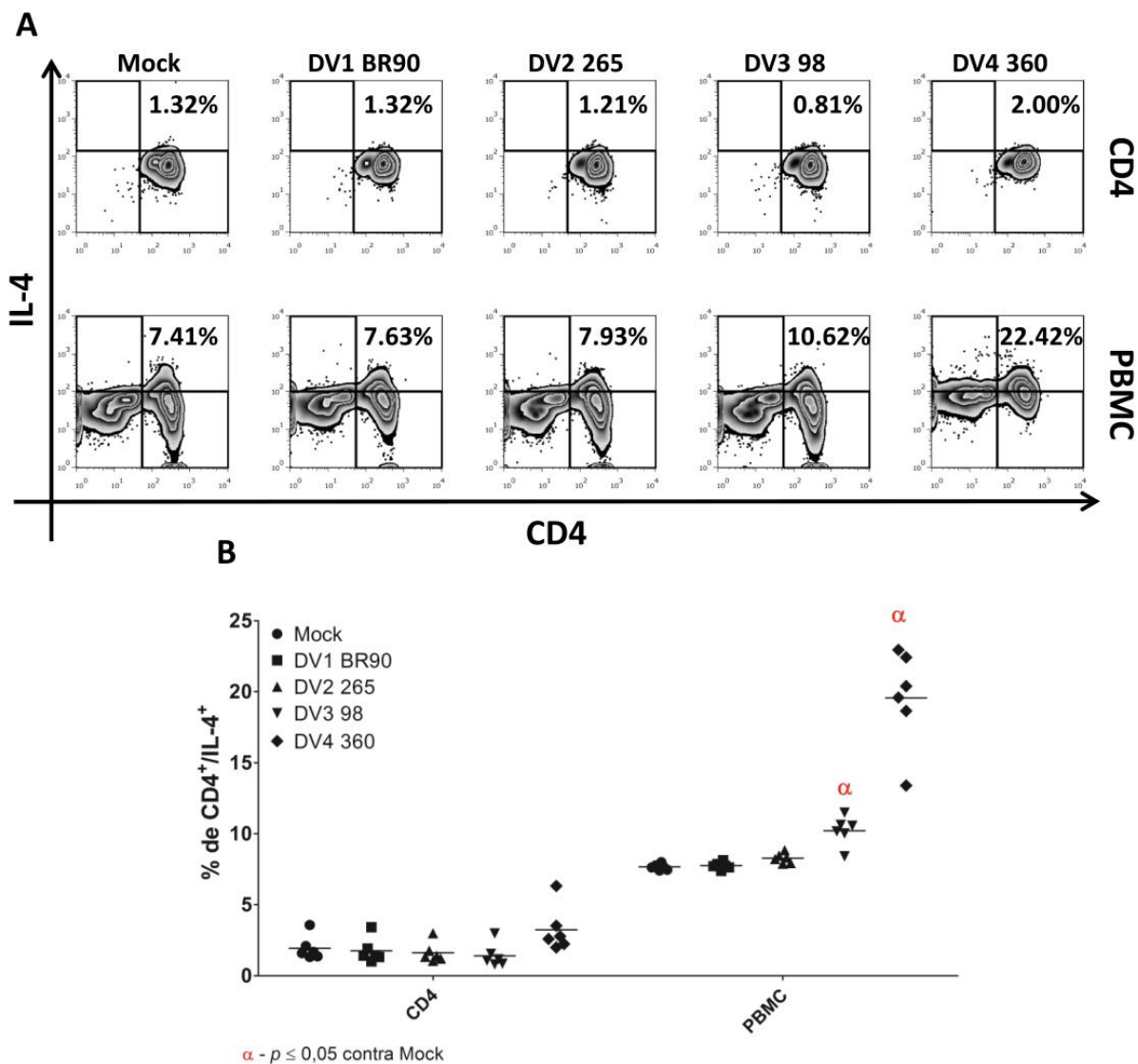


Figura 4.21 – Presença de células Th2 em culturas de PBMC infectadas pelo DV. Determinação da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ positivos para marcação intracelular de interleucina 4 (IL-4), na infecção pelo DV. (A) Exemplo representativo de zebra de análise para porcentagem de células positivas para CD4⁺/IL-4⁺ (polarização Th2), após a infecção por Mock ou DV, em culturas de enriquecidas por “cell-sorting” para linfócitos T CD4⁺ (superior) ou em culturas de PBMC (inferior). (B) Médias das porcentagens em culturas de células CD4⁺/IL-4⁺ de seis doadores diferentes presentes nas culturas enriquecidas para linfócitos T CD4⁺ (esquerda) ou em culturas de PBMC (direita), infectadas pelos DV. α = $p \leq 0,05$ contra Mock.

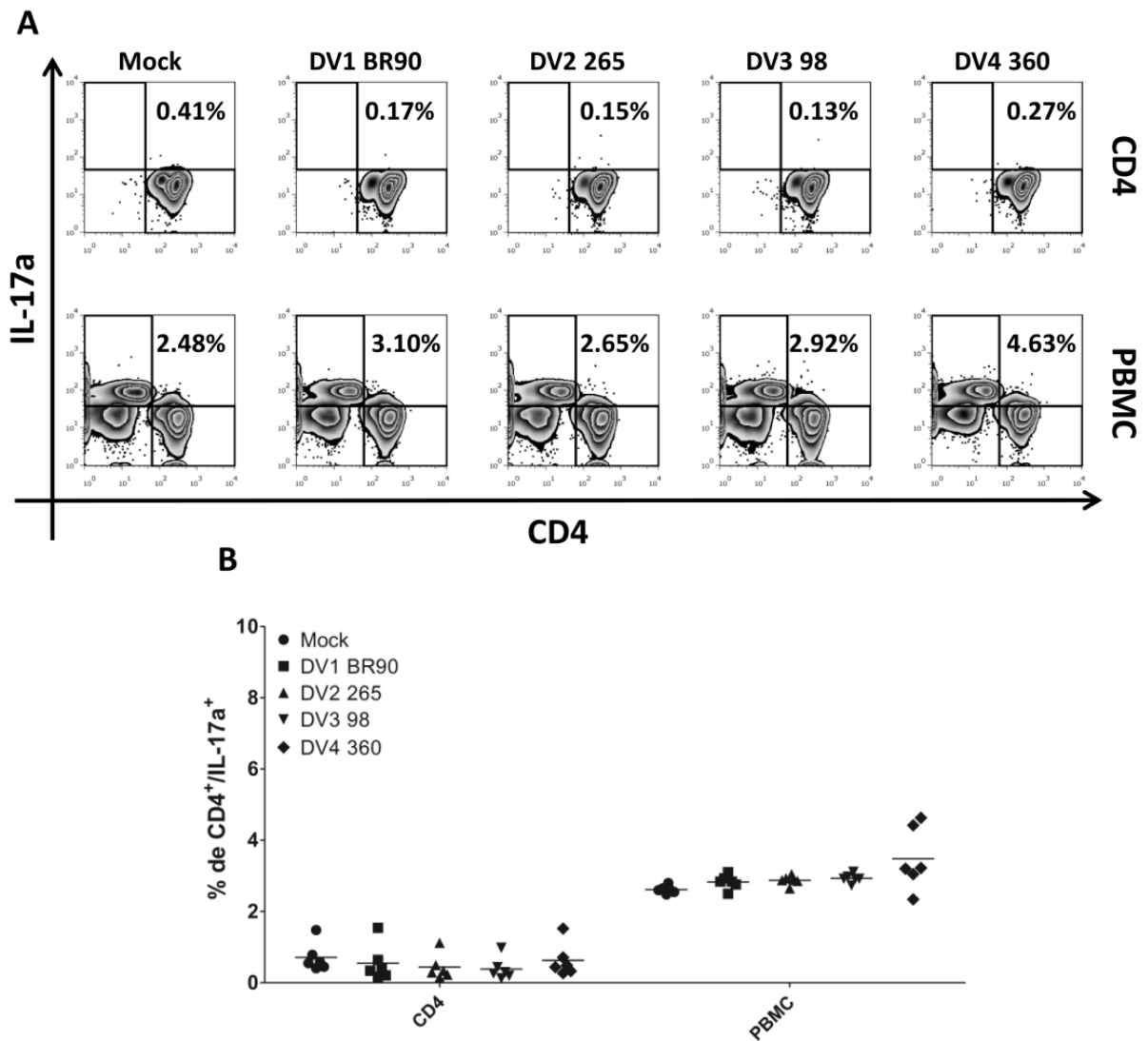


Figura 4.22 – Não ocorre polarização Th17 após a infecção de linfócitos pelo DV. Determinação da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ positivos para marcação intracelular de interleucina 17A (IL-17A), na infecção pelo DV. (A) Exemplo representativo de zebra de análise para porcentagem de células positivas para CD4⁺/IL-17A⁺ (polarização Th17), após a infecção por Mock ou DV, em culturas de enriquecidas por “cell-sorting” para linfócitos T CD4⁺ (superior) ou em culturas de PBMC (inferior). (B) Médias das porcentagens em culturas de células CD4⁺/IL-17A⁺ de seis doadores diferentes presentes nas culturas enriquecidas para linfócitos T CD4⁺ (esquerda) ou em culturas de PBMC (direita), infectadas pelos DV. $\alpha = p \leq 0,05$ contra Mock.

A análise destes resultados demonstrou que culturas enriquecidas de células T CD3⁺/CD4⁺, na presença do DV, não são induzidas a polarização Th1, Th2 ou Th17. Já em culturas de PBMC, apenas as infecções pelo DV3 98 e o DV4 360, induziram a uma polarização Th2, detectada pela marcação de células CD4⁺/IL-4⁺.

4.4.3 A infecção pelo DV não induz a secreção de IgM por linfócitos B CD19⁺

A teoria do ADE correlaciona a imunopatologia da dengue com a secreção de imunoglobulinas (Halstead e O'rourke, 1977). Ademais, foi descrito que linhagens de linfócitos B (BCL-1) em cultura são capazes de secretar IgM espontaneamente (Tutt *et al.*, 1985).

Neste contexto, foi testada a presença de IgM anti-DV no sobrenadante de culturas enriquecidas para os LB CD3⁺/CD19⁺ e também em culturas de PBMC, infectadas com DV. Inicialmente, foi determinada a porcentagem de células infectadas, onde a análise dos dados demonstrou valores semelhantes aos anteriores (Figura 4.23A e B). Já quando a presença de IgM anti-DV foi analisada, tanto nas culturas enriquecidas para LB CD19⁺ como nas PBMC, os valores ficaram abaixo da linha de corte do teste, indicando ausência de níveis detectáveis de IgM no sobrenadante das culturas (Figura 4.23C). Os controles positivo e negativo dos ensaios confirmaram a eficiência da reação (Figura 4.23C).

A análise dos dados permitiu concluir que o DV não é capaz de induzir a secreção do IgM anti-DV, seja em culturas de LB CD19⁺ seja em PBMC.

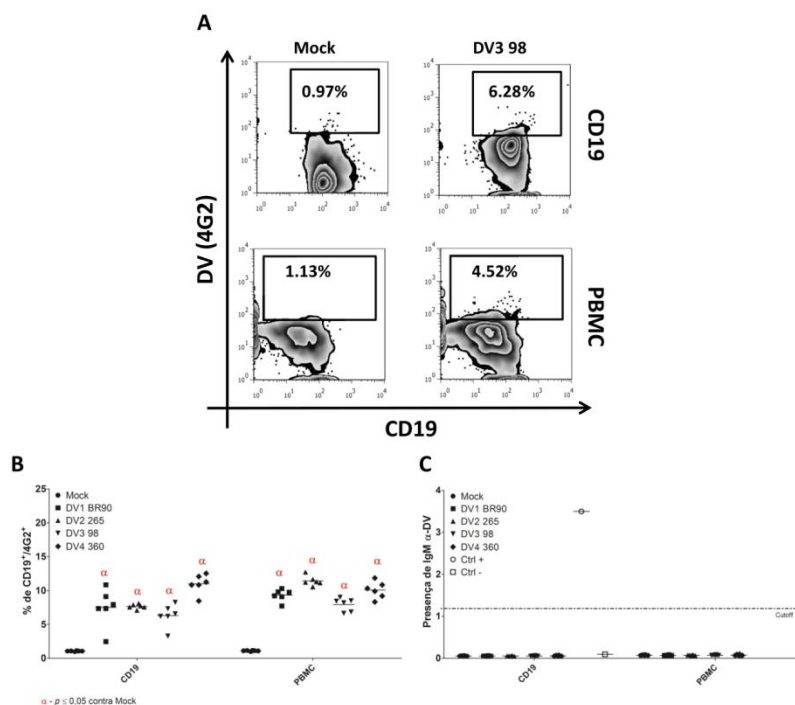


Figura 4.23 – A infecção pelo DV não induz a secreção de IgM em linfócitos B CD19⁺. (A) Exemplo representativo de zebra de análise para porcentagem de infecção em culturas enriquecidas em linfócitos B (CD3⁺/CD19⁺) ou PBMC, após a infecção por Mock (esquerda) ou pelo DV3 98 (direita). Médias das porcentagens de infecção (B) e index de secreção de IgM (C) em culturas de linfócitos B CD19⁺ e PBMC de seis doadores diferentes. A = p ≤ 0,05 contra Mock.

5 DISCUSSÃO

A dengue é considerada uma das mais prevalentes arboviroses atualmente, com aproximadamente 4 bilhões de pessoas vivendo em países com risco de contágio (WHO, 2012b; Bhatt *et al.*, 2013). A infecção por DV pode causar quadros clínicos bastante diversificados que vão desde uma infecção assintomática até a morte de pacientes com quadros de choque hipovolêmico (Rothman e Ennis, 1999; WHO, 2013). Apesar do quadro epidemiológico alarmante, é importante salientar que aproximadamente 80% dos casos de infecção pelo DV são assintomáticos, o que faz com que o número de casos seja subestimado (WHO, 2012a). Alguns estudos indicam que a dengue é uma imunopatologia, na qual as células do sistema imunológico, especialmente linfócitos, desempenham um papel crucial (Halstead e O'Rourke, 1977; Azeredo *et al.*, 2001; Mongkolsapaya *et al.*, 2003; Mongkolsapaya *et al.*, 2006). No entanto não há um consenso sobre a susceptibilidade dos linfócitos à infecção pelo DV, tendo sido publicado trabalhos que indicam que as células linfóides são infectadas (Kurane *et al.*, 1986; Mentor e Kurane, 1997; King *et al.*, 1999) e outros mostrando que os linfócitos não são infectados (Blackley *et al.*, 2007; Kou *et al.*, 2008).

Neste contexto, buscando determinar a susceptibilidade de linfócitos humanos ao DV, foram realizadas análises por citometria de fluxo, as quais demonstraram a infecção de linfócitos, seja em culturas de PBMC, de linfócitos totais (população CD14⁻ em PBMC) ou de culturas enriquecidas por “cell-sorting” para LT CD4⁺, LT CD8⁺ e LB CD19⁺. A porcentagem mais expressiva de células infectadas foi observada nos LT CD8⁺ (15% em média), para todas as condições de cultivo testadas. Em estudo de Kurane e colaboradores em 1990 foram demonstradas porcentagens de infecção de até 70% em diferentes linhagens de LB CD19⁺, LT CD4⁺ e LT CD8⁺ por DV2 *in vitro*. No trabalho de Kou e colaboradores em 2008 foi avaliada por citometria de fluxo a infecção *in vitro* pela cepa DV2 16681 de PBMC de doadores saudáveis, onde foi possível verificar a susceptibilidade de monócitos, mas não de LT ou LB.

Com o intuito de determinar se a infecção dos linfócitos foi produtiva, isto é, capaz de gerar partículas virais viáveis, a progênie viral foi titulada a partir de sobrenadantes de cultura, e valores em média superiores a 3Log₁₀ foram obtidos para todas as cepas testadas. Estes resultados corroboram os de Lin e colaboradores em 2002, no qual os autores demonstraram que culturas de linfócitos

humanos primários e linhagens de LB CD19⁺, infectados por cepas de DV3 e DV2, produziram títulos de mesma magnitude, porém em tempos mais precoces. Já no trabalho de Mentor e Kurane em 1997 a progênie viral foi detectada em níveis de 3Log₁₀ no sobrenadante de linhagens de LT CD4⁺ (JK44 e JK49), e LT CD8⁺ (CB2.8 e CB6.17), após 40 horas de infecção.

Adicionalmente, a replicação viral foi confirmada através dos níveis de mRNA para a proteína NS3 em linfócitos infectados por cepas dos quatro sorotipos do DV. No trabalho de Blackley e colaboradores em 2007, culturas de LT e LB provenientes do baço de doadores saudáveis foram infectadas com a cepa DV2 16681. Contudo, nestas infecções não foi possível realizar o isolamento do RNA viral nestas condições.

Visando confirmar a replicação do DV em linfócitos humanos *ex vivo*, a proteína viral NS1 foi quantificada no sobrenadante das culturas enriquecidas. Este dado corroborou os resultados da replicação viral, uma vez que a proteína NS1 é apenas sintetizada quando a infecção está instalada na célula alvo (Chambers *et al.*, 1990). Adicionalmente, a produção da proteína NS1 poderia estar envolvida na patogenia da dengue, pois, anticorpos anti-proteína NS1 podem ligar-se de forma cruzada a células endoteliais de pacientes infectados (Lin *et al.*, 2003). Esta ligação estaria vinculada com a lise de células endoteliais pelo sistema complemento do hospedeiro, o que pode aumentar a permeabilidade vascular, agravando o quadro clínico do paciente (Lin *et al.*, 2003).

Cabe salientar que as diferenças observadas entre os resultados deste estudo e os da literatura podem ser devido a diferentes abordagens experimentais como as características intrínsecas das cepas utilizadas, a utilização de linhagens celulares e não culturas primárias, além de diferenças na susceptibilidade dos diferentes doadores. Tomados em conjunto os resultados deste estudo demonstraram que os linfócitos humanos são susceptíveis ao DV. A replicação viral ocorre com a produção de partículas virais infectivas e a síntese e secreção da proteína NS1 no sobrenadante. Portanto, além dos monócitos e células dendríticas, considerados como importantes células-alvo durante a infecção por DV (Wu *et al.*, 2000), os linfócitos poderiam contribuir de forma significativa para a viremia observada em pacientes com dengue (Vaughn *et al.*, 2000).

A etapa seguinte foi demonstrar que um receptor de entrada do DV nos linfócitos humanos é o heparan sulfato. Este proteoglicano já foi caracterizado como um receptor de entrada do DV em células do ovário do hamster chinês [CHO (Chen

et al., 1997)], de epitélio renal de macaco [VERO (Germi *et al.*, 2002)], em hepatomas humanos [Huh7.5, (Hilgard e Stockert, 2000)] e em células endoteliais humanas (Dalrymple e Mackow, 2011). Porém, os resultados aqui apresentados não descartam a possibilidade de que outros receptores estejam envolvidos na permissividade dos linfócitos a infecção por DV. Moléculas como as Hsp90 e Hsp70 em U937 e macrófagos primários foram descritos como receptores para a infecção do DV2 cepa 16681 (Reyes-Del Valle *et al.*, 2005). Adicionalmente, no trabalho de Bielefeldt-Ohmann e colaboradores de 2001 foi demonstrada a infecção de linhagens de macrófagos, LT e LB humanos por cepas de DV2 (Nova Guiné) e DV4 (isolado clínico recente). Sendo que, o tratamento com heparina ou heparinase não apresentou efeito significativo na porcentagem de infecção. Os autores sugerem que vias alternativas à ligação com o domínio II da proteína viral E poderiam estar associadas à infecção das células humanas. Além disso, Bielefeldt-Ohmann e colaboradores (2001) utilizaram linhagens e não culturas primárias o que poderia justificar a diferença observada. Porém, em trabalhos posteriores, grupos independentes demonstraram que mutações no domínio II da proteína de envelope de diferentes cepas do DV2 causavam efeito deletério nas infecções de mosquitos *Aedes* adultos (Huang *et al.*, 2010) e na infecção de células de mamífero (VERO) (Roehrig *et al.*, 2013). A análise da porcentagem de infecção aqui apresentada demonstrou que o heparan sulfato é um receptor comum entre as cepas testadas. Já no trabalho de Acosta e colaboradores de 2012 foi demonstrado que a rota de internalização dos DV pode ser cepa-dependente. Em ensaios *in vitro* com as cepas de DV2 – 16681, DV2 – NGC (cepa New Guinea) e DV1 – HW, foi demonstrado um mecanismo de endocitose cepa-dependente para clatrina e Rab7, porém cepa-independente para Rab5, nas infecções de células VERO (Acosta *et al.*, 2012).

Uma vez evidenciada a susceptibilidade à infecção dos linfócitos pelo DV, ensaios foram realizados a fim de determinar qual seria a resposta destes linfócitos durante a infecção pelos DV. Neste sentido, foram determinados os níveis de citocinas produzidos pelas células após a infecção. Os resultados evidenciaram a produção de citocinas de perfil Th1, especialmente IL-10, com média de 93,17 pg/mL. Em trabalho recente, Malavige e colaboradores demonstraram que a IL-10 estaria presente no soro de crianças naturalmente infectadas pelo DV corroborando nossos achados, porém o nível médio encontrado em pacientes com quadros de FD foi acima de 115,8 pg/mL, e no caso de pacientes com FHD este valor foi superior.

Além da IL-10, outra citocina detectada nas infecções de PBMC foi TNF- α . Em

trabalho anterior de Gagnon e colaboradores foi demonstrada a função citotóxica de LT CD4⁺ específicos na lise de células HepG2 “bystander” ao DV, utilizando-se mecanismos como a interação de Fas/FasL e a produção de TNF- α (Gagnon *et al.*, 1999). Os níveis de TNF- α encontrados (220 pg/mL em média) foram superiores aos dados aqui apresentados (10 pg/mL em média), sugerindo que níveis mais expressivos de TNF- α são necessários para a ação citotóxica mediada por esta citocina (Gagnon *et al.*, 1999).

Baixos níveis de IFN- γ foram também encontrados em culturas de PBMC infectadas com DV (30 pg/mL em média). Em 2011, Fagundes e colaboradores demonstraram a produção de 1 a 2 ng/mL de IFN- γ no soro de camundongos infectados com cepa de DV2 adaptada. Cabe salientar que diferentes trabalhos já demonstram que elevados níveis de TNF- α em detrimento de IFN- γ produzidos por linfócitos ativados teriam um papel no desenvolvimento de sintomas (diminuição da permeabilidade vascular, apoptose de células endoteliais) presentes nos casos de dengue com complicações (Azeredo *et al.*, 2001; Mongkolsapaya *et al.*, 2003; Avirutnan *et al.*, 2006; Mongkolsapaya *et al.*, 2006; Myint *et al.*, 2006; Dejnirattisai *et al.*, 2008). Porém, a análise dos dados sugere que a infecção dos linfócitos por DV não teria um papel importante na indução de produção de citocinas, devido aos baixos níveis de ativação destas células.

A fim de se avaliar a ativação de linfócitos após a infecção por DV, foram determinadas as porcentagens do marcador celular CD69. A análise destes resultados indicou que apesar da infecção, não ocorreram níveis significativos de ativação, em concordância com os baixos níveis de produção de citocinas obtidos. No trabalho de Mathew e colaboradores em 1999 foi observado que linfócitos provenientes de pacientes com FD apresentaram menores índices de ativação celular, após tratamento com PHA, anti-CD3, toxóide tetânico ou antígenos de dengue, quando comparadas com as células controle (doadores saudáveis)(Mathew *et al.*, 1999).

A demonstração de que os linfócitos infectados por DV não foram ativados em níveis significativos poderia sugerir que a infecção ocorresse preferencialmente em células “naïve”. Em consonância com esta hipótese, Kurane e Ennis em 1987 mostraram que o DV teria menor capacidade de replicação em monócitos ativados, onde as células induzidas por IFN do tipo I passam a expressar genes com funções antivirais como MX1, Eif2ak2, PKR. Neste contexto, ensaios de infecção foram realizados em células ativadas pela ação de ConA ou PHA. Uma redução

significativa na porcentagem de infecção foi observada. Esta diminuição está de acordo com a hipótese de que células “naïve” sejam mais susceptíveis à infecção pelo DV. No entanto, ainda existem lacunas relacionadas ao mecanismo pelo qual as células não são significativamente ativadas após a infecção pelo DV. Três possíveis hipóteses foram formuladas para explicar a relação entre linfócitos infectados e o DV: a) as células infectadas seriam induzidas à morte, não podendo desta forma responder ativamente; b) o DV teria algum mecanismo de regulação ativa da resposta funcional dos linfócitos frente à infecção, impedindo assim que estas células respondam; c) o DV teria a capacidade de infectar e replicar em linfócitos humanos, porém de forma insuficiente para induzir a ativação celular.

Buscando avaliar a primeira hipótese, foram realizados ensaios para determinar a porcentagem de morte celular nas culturas infectadas. Trabalhos anteriores evidenciaram a morte celular de monócitos e outras linhagens celulares infectadas pelos DV (Duarte Dos Santos *et al.*, 2000; Espina *et al.*, 2003; Torrentes-Carvalho *et al.*, 2009; Klomporn *et al.*, 2011). A análise de PBMC infectado pelos DV demonstrou uma correlação positiva entre morte celular e infecção dos monócitos, porém não foi observada esta correlação para os linfócitos. A resistência celular poderia sugerir um mecanismo de escape viral. Em trabalho recente de Laskus e colaboradores (2013) foi demonstrado que pacientes co-infectados por HCV/HIV teriam menores índices de apoptose de LT CD4⁺ e LT CD8⁺. No mesmo trabalho demonstrou-se que a infecção de LT CD4⁺ (linhagem Daudi) pelo HCV seria capaz de reduzir a morte destas células mediada pelo HIV. Apesar do mesmo efeito não ter ainda sido demonstrado para infecções pelo DV, cabe salientar que mecanismos de escape são conservados dentro da mesma família viral (Diamond, 2003).

Mongkolsapaya e colaboradores em 2003 mostraram que a apoptose de linfócitos é um mecanismo importante na patogênese da dengue. Os autores sugerem uma correlação entre a apresentação de antígenos de baixa avidéz e a apoptose celular, e não a morte dos linfócitos pela replicação viral (Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Em trabalho realizado por nosso grupo em 2011 foi possível demonstrar a apoptose de células dendríticas humanas induzida pela infecção por DV isolado de um caso fatal (Silveira *et al.*, 2011). Além disso, foi relatado por Limonta e colaboradores em 2007 sinais de apoptose celular em análises histológicas de fígado, cérebro, intestino e pulmões provenientes de necropsias de pacientes com SCD. Os dados aqui apresentados sugerem que este não seja um mecanismo importante na infecção de linfócitos pelo DV *ex vivo*. Além disso, a

análise dos resultados sugere que os baixos níveis de ativação dos linfócitos infectados não seriam resultado da morte celular. Portanto, foram realizados ensaios buscando avaliar a hipótese de que os DV poderiam regular ativamente a resposta funcional dos linfócitos infectados, impedindo assim a produção de citocinas e/ou a ativação celular.

Algumas das teorias propostas para explicar os casos graves de dengue dizem respeito à apresentação e ao reconhecimento de antígenos de baixa avidéz (Azeredo *et al.*, 2001; Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Adicionalmente, em 2011 Hansen e colaboradores demonstraram utilizando o ensaio de EML, que células dendríticas infectadas por cepas do vírus da varíola bovina teriam menor capacidade de modular a proliferação de LT. Já no trabalho clássico de Konttinen e colaboradores foi observada a indução à proliferação por EML de LB CD19⁺ infectados pelo vírus Epstein-Barr, com a diminuição da proliferação pela ação citotóxica de LT CD8⁺ (Konttinen *et al.*, 1985). Decidimos então avaliar a capacidade de proliferação de linfócitos infectados pelos DV após a apresentação de antígenos “non-self” via HLA, promovida por imdDCs alogênicas. Não foi observada diminuição da proliferação celular em resposta as infecções por DV, sugerindo que os mecanismos de regulação da proliferação de linfócitos envolvidos durante as infecções pelos vírus Epstein-Barr ou da varíola bovina, não estão presentes em infecções pelos DV. Interessantemente, foi observado que as células infectadas pelo DV4 360 sofreram um discreto aumento na proliferação promovida no EML. Já foi demonstrado que cepas dos quatro sorotipos de DV teriam a capacidade de induzir a expressão do HLA em DC infectadas, mecanismo que pode estar envolvido na facilitação da apresentação de antígenos “non-self” observado no EML realizado com a cepa DV4 360 (Figura 4.14) (Othman *et al.*, 2010).

Dando continuidade as avaliações da proliferação celular de linfócitos infectados pelos DV, foi realizado o ensaio de EPL, utilizando-se para tanto a cepa do vírus vacinal de febre amarela, YF 17DD. Protocolos semelhantes já foram anteriormente realizados e demonstraram a proliferação de linfócitos frente ao “prime” e “boost” com patógenos completos ou peptídeos derivados destes patógenos (Hirsch *et al.*, 1981; Kong *et al.*, 2004; Soo Hoo *et al.*, 2006; Hung *et al.*, 2010). Os resultados demonstraram mais uma vez que não ocorreu regulação pela infecção de DV na proliferação celular, e que na presença da cepa DV4 360, a proliferação celular foi facilitada, corroborando os dados observados no ensaio de EML (Figura 4.15A e B). Como discutido anteriormente, a influência positiva na

proliferação celular indicada pelos resultados de EML e EPL exercida pelo DV4 360 sobre os linfócitos necessita de maiores investigações, mas podem estar relacionadas à maior indução de expressão do HLA pelas APC. Outra hipótese proposta para explicar a proliferação em EPL seria a ocorrência de reações cruzadas entre as proteínas de DV e da cepa vacinal YF 17DD, que poderiam ser reconhecidas durante a apresentação de antígeno. É interessante observar que, a exacerbação da proliferação observada nos ensaios de EML e EPL na presença do DV4 360, poderia apresentar alguma relação com a patogênese da dengue, onde LT são induzidos à expansão clonal por ligações de baixa avidéz em exposição durante infecção com sorotipo viral heterólogo (Azeredo *et al.*, 2001).

Outro aspecto examinado nas culturas de linfócitos totais infectadas por DV foi a degranulação de LT CD8⁺ e a secreção de granzimas e perforinas. Foi possível demonstrar que a infecção não foi capaz de induzir níveis significativos de degranulação de LT CD8⁺. Além disso, a presença do vírus nas células não teve influência sobre a degranulação induzida pelo estímulo com PHA. Porém, foi demonstrado que o estímulo viral foi capaz de induzir a secreção de granzimas e perforinas em culturas de linfócitos totais. Sendo assim, a liberação destes mediadores pode ter ocorrido por outras células com função de citotoxicidade, como as células “Natural Killer” (NK). Em 1988, Homchampa e colaboradores demonstraram a importância das células NK nos casos graves de dengue em crianças na Tailândia. Em trabalho mais recente (2011), St John e colaboradores descreveram que a imuno vigilância de mastócitos nas infecções por dengue pode promover o recrutamento de células NK e NKT o que levaria à resolução da infecção. Além disso, Bade e colaboradores em 2005 observaram níveis elevados de granzimas no soro de pacientes infectados por DV.

A análise conjunta dos dados indica que a infecção de linfócitos totais por DV não seria capaz de regular as funções gerais de resposta destas células (produção de citocinas, ativação, morte celular, proliferação e degranulação de LT CD8⁺). Buscando avaliar a última hipótese proposta sobre a interação de linfócitos humanos com DV, foram realizados ensaios a fim de determinar a indução das respostas funcionais específicas de cada população celular. Foram avaliadas funções com potencial correlação com as teorias que buscam explicar os mecanismos envolvidos na patogênese da dengue. Inicialmente, foram realizados experimentos a fim de determinar a susceptibilidade de LT CD8⁺ de memória ou “naive” à infecção por DV. Para tanto, culturas enriquecidas de LT CD8⁺ de memória (CD45RA⁺), LT CD8⁺

“naïve” (CD45RO⁺) ou LT CD8⁺ totais foram infectadas com cepas dos quatro sorotipos de DV e as porcentagens de infecção além da produção de granzima foram avaliadas. Os dados demonstraram que a susceptibilidade nas três subpopulações de LT CD8⁺ foi a mesma, indicando não haver seletividade na infecção de LT CD8⁺. Este resultado difere do observado na infecção de linfócitos pelo HIV, onde o vírus apresenta tropismo por células T CD8⁺/CD45RA⁺ (Robichaud, 2002).

Já as dosagens de granzima revelaram que não foram secretados níveis estatisticamente diferentes deste mediador no sobrenadante das culturas enriquecidas para as três subpopulações de LT CD8⁺. Nos experimentos apresentados na Figura 4.16, foi sugerido que a secreção dos mediadores de citotoxicidade tenha ocorrido pela ação de células NK. Os resultados aqui obtidos concordam com esta tese, uma vez que nas culturas enriquecidas para CD3⁺/CD8⁺ não está presente a população de células NK (CD3⁻/CD8⁺/CD161⁺/CD56⁺).

Buscando a continuidade das análises das respostas específicas à infecção pelo DV foi determinada a polarização Th1/Th2/Th17 em culturas enriquecidas para LT CD4⁺ ou PBMC infectadas pelo DV. Os resultados mostraram que em culturas de PBMC, apenas nas infecções com as cepas DV3 98 e DV4 360 foi observada a polarização de perfil Th2 sugerindo, portanto, um mecanismo cepa-específica. As células Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-13 e induzem a ativação de mastócitos e eosinófilos, sendo esta uma resposta inflamatória pouco eficiente no combate às infecções virais. O perfil Th2 já foi descrito como sendo vinculado aos casos de dengue com complicações (Chaturvedi *et al.*, 1999). Ademais, em trabalho recente de Maneekan e colaboradores, foi determinado níveis ligeiramente aumentados de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN- γ e TNF- α (citocinas tanto do perfil Th1 quanto do Th2) em pacientes com FHD quando comparados com pacientes com FD (Maneekan *et al.*, 2013). Além disso, Mustafa e colaboradores em 2001 mostraram níveis elevados de citocinas de perfil Th2 (IL-3 e IL-8) em soro de pacientes com FHD em comparação a pacientes com FD. Cabe ainda salientar que apesar da porcentagem de células positivas para o perfil Th2, não foram encontrados níveis significativos de IL-4 (citocina diferencial do perfil Th2) no sobrenadante das culturas de PBMC. Esta condição concorda com o trabalho de Xu e colaboradores em 2008 onde foi descrito que em células HepG2 ocorre o envolvimento da proteína reguladora do tráfego de vesículas Rab8 durante infecção por DV, mobilizando desta forma as vesículas secretórias no citoplasma celular. Adicionalmente, nos mesmos

ensaios de polarização de perfil Th1 e Th17 foram observadas populações celulares com marcação CD4⁻/IFN-γ⁺ e CD4⁻/IL-17A⁺, respectivamente. Esta marcação pode evidenciar a presença de uma população de LT CD8⁺ na cultura de PBMC, positiva para as citocinas testadas. O LT CD8⁺ é capaz de produzir IFN-γ (Kurane *et al.*, 1989) ou IL-17A (Nigam *et al.*, 2011) como resposta às infecções virais.

Subsequentemente a determinação das respostas específicas de cada população celular infectada, foram analisadas as culturas enriquecidas em LB CD19⁺. Foi anteriormente descrito que células BCL-1 (linhagem de LB CD19⁺) são capazes de secretar espontaneamente IgM (Tutt *et al.*, 1985). Além disso, uma das hipóteses propostas para os casos graves de dengue diz respeito à imunoglobulinas de baixa especificidade em infecções secundárias heterotípicas (Halstead e O'Rourke, 1977). Neste panorama, foram realizadas as determinações qualitativas de IgM anti-DV no sobrenadante das culturas enriquecidas para LB CD19⁺. Os resultados demonstraram a ausência desta imunoglobulina em níveis detectáveis, apesar da positividade para a infecção viral. King e colaboradores (1999) demonstraram que as células B CD19⁺ eram as principais células mononucleares circulantes infectadas por cepas de DV1 e DV2. Culturas de células B CD19⁺ foram obtidas de pacientes com FD, sendo possível realizar o isolamento viral destas culturas, porém não foram detectados níveis significativos de IgM no sobrenadante das culturas.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível demonstrar que os linfócitos são susceptíveis à infecção pelos quatro sorotipos de DV, porém, com maiores índices de infecção apresentados pelos LT CD8⁺, comparativamente aos LT CD4⁺ ou LB CD19⁺. Esta infecção ocorre com participação de moléculas de heparam sulfato presentes na superfície celular como receptor de entrada dos DV. Apesar da infecção dos linfócitos pelo DV ser produtiva, com replicação ativa, liberação de partículas virais viáveis e secreção da proteína NS1 pelas células infectadas, parece não haver níveis significativos de ativação celular ou de produção de citocinas, sendo demonstrado ainda que a ativação prévia das células com ConA ou PHA diminuí a sensibilidade dos linfócitos à infecção pelo DV. Adicionalmente, foi analisada a morte celular, a degranulação de LT CD8⁺, a infecção diferencial de LT CD8⁺ “naïve” e de memória, a polarização Th1/Th17 de LT CD4⁺ e a produção espontânea de IgM anti-DV de LB CD19⁺, sendo que estes parâmetros não foram modulados, de forma significativa, pelo DV. Porém, foram observadas populações de células CD4⁺/IL-4⁺ em PBMC infectados pela cepa DV3 98, sugerindo uma polarização de resposta Th2. Além disso, a cepa DV3 360, além da presença de células CD4⁺/IL-4⁺, induziu um discreto aumento na proliferação celular (Diagrama 6.1).

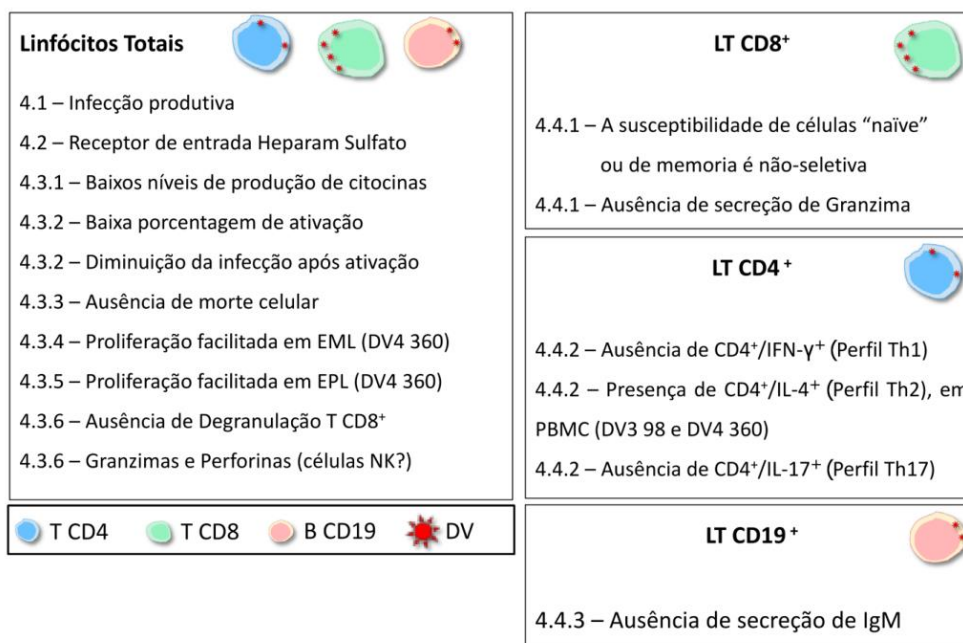


Diagrama 6.1 – Sumário do estudo da susceptibilidade e resposta de linfócitos humanos ao vírus da dengue. Respostas obtidas em culturas de linfócitos totais, LT CD4⁺, LT CD8⁺ e LB CD19⁺.

Além do papel dos linfócitos nos fenômenos de ADE e pecado original de células T, os dados aqui apresentados permitem sugerir que estas células podem contribuir de forma significativa para a viremia na infecção pelo dengue, o que já foi demonstrado, contribui para a gênese das formas graves da dengue (Vaughn *et al.*, 2000). No entanto, apesar disso, a infecção dos linfócitos pelo DV parece ser bem tolerada pelas células, sem indução de resposta inflamatória importante em duas das quatro cepas analisadas (DV1 BR90 e DV2 265), concordando com a hipótese de que a infecção seria insuficiente para induzir respostas funcionais nos linfócitos. Porém, a polarização para o perfil Th2 (DV3 98 e DV4 360), a proliferação exacerbada (DV4 360), bem como a secreção de mediadores de citotoxicidade como a granzima, poderia ser vinculada a casos graves de dengue (Diagrama 6.2).

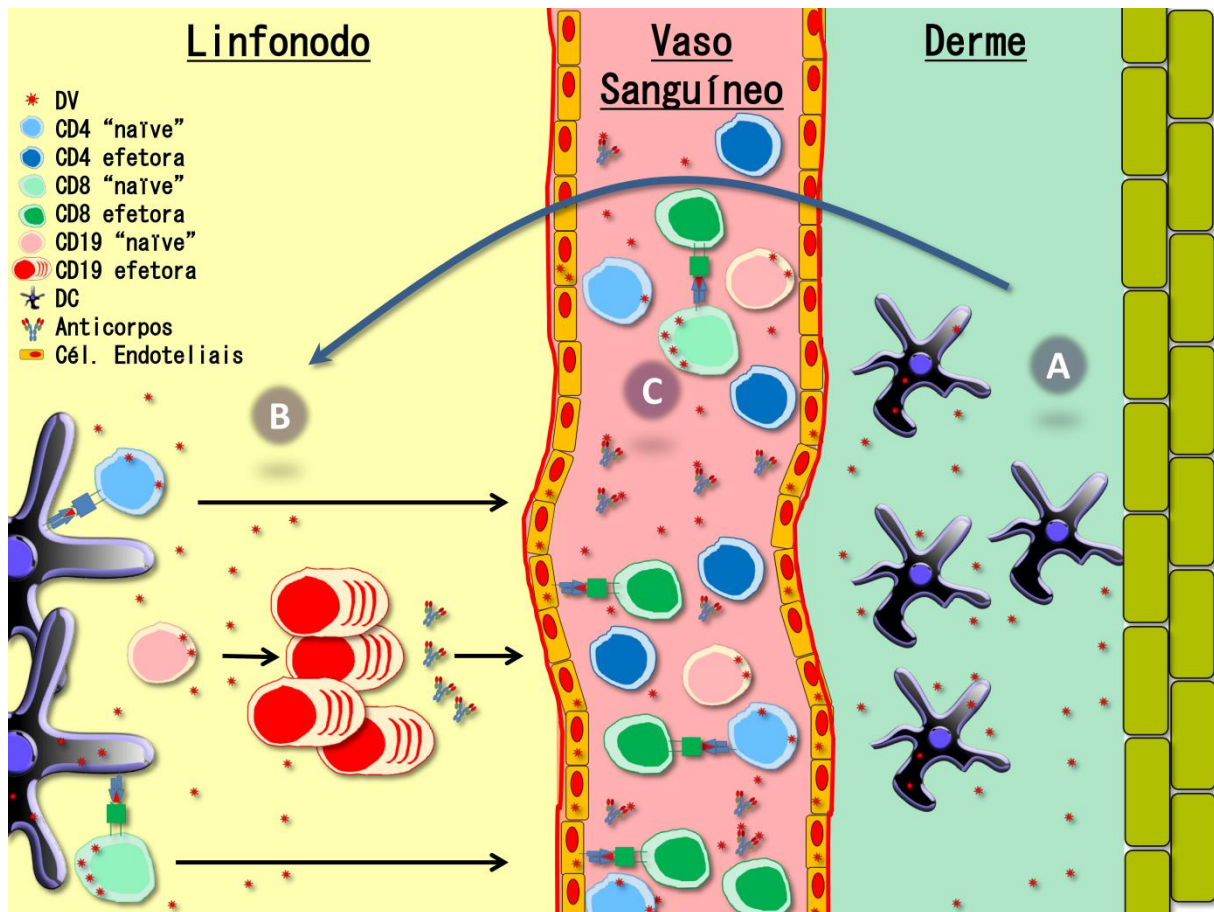


Diagrama 6.2 – Hipótese do efeito da infecção de linfócitos humanos pelo DV na patogenia da dengue. (A) Uma vez inoculado no homem, a infecção das DC pelo DV induziria à ativação destas células. Adicionalmente, DC podem ser ativadas pela fagocitose de corpos apoptóticos provenientes de outras células infectadas. (Kurane *et al.*, 1991; Dejnirattisai *et al.*, 2008; Chase *et al.*, 2011). (B) Uma vez ativadas as DC migram aos linfonodos, carregando partículas virais (Rosen *et al.*, 1999; Navarro-Sanchez *et al.*, 2005). Já nos linfonodos os DV poderiam infectar linfócitos "naïve". A infecção destas células induziria níveis discretos de ativação celular. Linfócitos "naïve" infectados podem ser induzidos à ativação e expansão clonal após a apresentação de antígenos virais pelas DC. Com a ativação, os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ efetores migram dos linfonodos. Além disso, anticorpos anti-DV secretados por linfócitos B CD19⁺ efetores são liberados na corrente sanguínea. Estas células ativadas teriam menor susceptibilidade à infecção pelos DV. (C) Uma vez na corrente sanguínea, os linfócitos efetores podem responder à infecção de outros linfócitos "naïve" infectados, além de combater a infecção de células endoteliais. Além dos linfócitos efetores, a secreção de granzimas e perforinas, provavelmente por células NK, poderia elevar a apoptose de células endoteliais. Já a resposta efetora de perfil Th2, poderia elevar o caráter inflamatório local, induzindo ainda mais à morte celular. Ambos estes fatores poderiam influenciar o desenvolvimento de casos graves, com o aumento da permeabilidade vascular. Sendo que, uma vez que a infecção dos linfócitos "naïve" pelos DV presentes na corrente sanguínea não seria capaz de induzir à resposta funcional destas células, os linfócitos infectados poderiam também contribuir com o aumento na viremia, exacerbando a resposta imunológica.

7 PERSPECTIVAS

- Determinar a susceptibilidade e a resposta funcional de linfócitos *ex vivo*, provenientes de pacientes com dengue;
- Avaliar diferenças moleculares do DV4 360 em relação às demais cepas estudadas e que possam estar influenciando na resposta proliferativa e de polarização de linfócitos infectados por esta cepa. Determinando assim possíveis mecanismos cepa-dependentes que possam estar aliadas à imunopatogenia da dengue em infecções primárias;
- Testar os níveis de IgM totais que possam estar sendo secretados por LB CD19⁺ em culturas enriquecidas para esta população e culturas de PBMC, provenientes de doadores com histórico de infecção por DV e pacientes com dengue;
- Avaliar os níveis de heparan sulfato na superfície de linfócitos totais, infectados ou não pelo DV;
- Determinar as condições de apresentação de antígeno, em ensaios de “prime” de linfócitos em culturas enriquecidas para LT CD4⁺ e LT CD8⁺ ou PBMC, provenientes de voluntários saudáveis com histórico de infecção por DV e pacientes infectados com o DV;
- Testar a capacidade de degranulação de LT CD8⁺, NK e/ou NKT na infecção pelo DV em co-culturas de PBMC e células endoteliais, determinando as células secretoras de granzimas e perforinas;

8 ANEXOS

8.1 Anexo I – Formulas dos reagentes

NaCl 0,9%:

9 g de NaCl;
1 L de H₂O Milique (em garrafa de cultivo);
Filtrar em filtro 0,22 mm.

P.B.E.:

1 L Phosphate-Buffered Saline 1X (PBS);
5 g Bovine Serum Albumin (BSA);
0,58 g Etilenodiaminotetracético (EDTA);
Ajustar o pH para 7,2. Filtra em filtro 0,22 mm.

NH₃Cl₂ – Solução de Lise:

0,89 g Cloreto de Amônio (NH₄Cl);
0,034 g Etilenodiaminotetracético (EDTA);
0,08 g Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃);
100 mL de H₂O Milique (em garrafa de cultivo);
Filtrar em filtro de 0,22 mm

AP Buffer

2 mL de NaCl 5M (29,2 g de NaCl in 100 mL de H₂O)
10 mL de Tris 1M (pH 9.5)
5 mL MgCl₂ 1M (20,3 g of MgCl₂•6H₂O in 100 mL H₂O.)
500 µL de Tween 20 (20%)
qsp 100 mL de H₂O

RPMI 1640 completo:

500 mL de RPMI 1640 + CH₂Na não suplementado;
50 mL de Soro Fetal Bovino (SFB);
5,25 mL de Glutamina (10.000 U/mL);
5,25 mL de Penicilina/Streptomicina (50 U/mL);
5,25 mL de Anfotericina (10.000 U/mL);

TB – Tampão de Bloqueio:

50 mL Phosphate-Buffered Saline 1X (PBS);
2,5 mL de Soro Fetal Bovino (SFB);
0,5 mL de Soro Humano AB;

L15 2x completo:

20 g de L-15 (Gibco, cat – 41300-039)
5% SFB
0,26% Triptose
25 µg/mL Getamicina
200 mL de H₂O Milique

8.2 Anexo II – Lista das culturas

Experimento	Voluntário	Gênero	Idade	His/Deng	Nº Tubos	Volume (mL)
Exp 01 - PBMC	D_VIII	F	25	N	8	58
Exp 01 - PBMC	D_XXI	M	25	N	9	65
Exp 01 - PBMC	D_XXIII	M	24	N	7	50
Exp 01 - PBMC	D_XXIV	M	26	N	7	50
Exp 01 - PBMC	D_XXIV	M	33	N	7	50
Exp 01 - PBMC	D_XXVII	F	23	N	6	43
Exp 02 - Lc	D_X	F	31	N	12	86
Exp 02 - Lc	D_XI	F	31	N	15	108
Exp 02 - Lc	D_XIII	M	35	N	13	94
Exp 02 - Lc	D_XVI	M	33	N	12	86
Exp 02 - Lc	D_XVII	M	29	N	13	94
Exp 02 - Lc	D_XXVI	F	35	N	14	101
Exp 03 - Sorting	D_II	F	25	N	17	122
Exp 03 - Sorting	D_X	F	33	N	15	108
Exp 03 - Sorting	D_XII	M	35	N	16	115
Exp 03 - Sorting	D_XV	M	30	N	14	101
Exp 03 - Sorting	D_XXIX	F	31	N	15	108
Exp 03 - Sorting	D_XXXI	F	29	N	16	115
Exp 04 - Confocal	D_I	F	25	N	12	86
Exp 04 - Confocal	D_IV	F	37	N	13	94
Exp 04 - Confocal	D_IX	M	34	N	12	86
Exp 04 - Confocal	D_XVII	F	22	N	11	79
Exp 04 - Confocal	D_XXV	F	33	N	12	86
Exp 04 - Confocal	D_XXIX	M	31	N	14	101
Exp 05 - Superinfec	D_VII	M	33	N	13	94
Exp 05 - Superinfec	D_X	F	31	N	12	86
Exp 05 - Superinfec	D_XVI	M	33	N	12	86
Exp 05 - Superinfec	D_XVIII	F	32	N	12	86
Exp 05 - Superinfec	D_XXVI	F	35	N	14	101
Exp 05 - Superinfec	D_XXXI	F	29	N	16	115
Exp 06 - Heparin/Hepar	D_III	M	30	N	10	72
Exp 06 - Heparin/Hepar	D_V	M	26	N	11	79
Exp 06 - Heparin/Hepar	D_VI	F	34	N	10	72
Exp 06 - Heparin/Hepar	D_XVIII	M	35	N	10	72
Exp 06 - Heparin/Hepar	D_XXII	F	25	N	13	94
Exp 06 - Heparin/Hepar	D_XXX	F	26	N	16	115
Exp 07 - Ativação	D_X	F	31	N	12	86
Exp 07 - Ativação	D_XVI	M	33	N	12	86
Exp 07 - Ativação	D_XVII	M	29	N	13	94
Exp 07 - Ativação	D_XVIII	M	35	N	10	72
Exp 07 - Ativação	D_XXVI	F	35	N	14	101
Exp 07 - Ativação	D_XXVIII	F	23	N	16	115
Exp 08 - Apop	D_VI	F	34	N	10	72
Exp 08 - Apop	D_VIII	F	25	N	10	72

Experimento	Voluntário	Gênero	Idade	His/Deng	N° Tubos	Volume (mL)
Exp 08 - Apop	D_XVI	M	33	N	12	86
Exp 08 - Apop	D_XXII	F	25	N	13	94
Exp 08 - Apop	D_XXIV	M	33	N	13	94
Exp 09 - Degra	D_I	F	25	N	12	86
Exp 09 - Degra	D_X	F	31	N	12	86
Exp 09 - Degra	D_XVII	M	29	N	13	94
Exp 09 - Degra	D_XIX	F	33	N	11	79
Exp 09 - Degra	D_XXVI	F	35	N	14	101
Exp 09 - Degra	D_XXIX	F	31	N	15	108
Exp 10 - EML	D_III	M	30	N	10	72
Exp 10 - EML	D_V	M	26	N	11	79
Exp 10 - EML	D_VII	M	33	N	13	94
Exp 10 - EML	D_XVI	M	33	N	12	86
Exp 10 - EML	D_XXII	F	25	N	13	94
Exp 10 - EML	D_XXXI	F	29	N	11	79
Exp 11 - Prime	D_II	F	25	N	17	122
Exp 11 - Prime	D_X	F	31	N	12	86
Exp 11 - Prime	D_XVII	M	29	N	13	94
Exp 11 - Prime	D_XVIII	M	35	N	10	72
Exp 11 - Prime	D_XX	F	33	N	11	79
Exp 11 - Prime	D_XXVI	F	35	N	14	101

Experimento	N° Lc			N° DC		Método	Eficiencia (%)
	N° PBMC (x10E6)	(x10E6)	N° Mo (x10E6)	(x10E6)			
Exp 01 - PBMC	74,12	64,93	6,60	6,01	Sep	0,00	
Exp 01 - PBMC	86,19	75,50	7,68	6,99	Sep	0,00	
Exp 01 - PBMC	86,19	75,50	7,68	6,99	Sep	0,00	
Exp 01 - PBMC	86,19	75,50	7,68	6,99	Sep	0,00	
Exp 01 - PBMC	99,98	87,58	8,91	8,11	Sep	0,00	
Exp 01 - PBMC	112,04	98,15	9,98	9,08	Sep	0,00	
Exp 02 - Lc	148,24	129,86	13,21	12,02	Beads	7,77	
Exp 02 - Lc	148,24	129,86	13,21	12,02	Beads	7,77	
Exp 02 - Lc	162,03	141,94	14,44	13,14	Beads	8,30	
Exp 02 - Lc	162,03	141,94	14,44	13,14	Beads	8,30	
Exp 02 - Lc	174,1	152,51	15,51	14,12	Beads	8,78	
Exp 02 - Lc	186,16	163,08	16,59	15,09	Beads	2,94	
Exp 03 - Sorting	174,1	152,51	15,51	14,12	Sorting	2,48	
Exp 03 - Sorting	186,16	163,08	16,59	15,09	Sorting	2,94	
Exp 03 - Sorting	186,16	163,08	16,59	15,09	Sorting	2,94	
Exp 03 - Sorting	198,23	173,65	17,66	16,07	Sorting	3,42	
Exp 03 - Sorting	198,23	173,65	17,66	16,07	Sorting	3,42	
Exp 03 - Sorting	210,29	184,21	18,74	17,05	Sorting	3,89	
Exp 04 - Confocal	136,17	119,28	12,13	11,04	Beads	7,31	
Exp 04 - Confocal	148,24	129,86	13,21	12,02	Beads	7,77	
Exp 04 - Confocal	148,24	129,86	13,21	12,02	Beads	7,77	
Exp 04 - Confocal	148,24	129,86	13,21	12,02	Beads	7,77	

Experimento	N° PBMC (x10E6)	N° Lc (x10E6)	N° Mo (x10E6)	N° DC (x10E6)	Método	Eficiencia (%)
Exp 04 - Confocal	174,1	152,51	15,51	14,12	Beads	8,78
Exp 05 - Superinfec	148,24	129,86	13,21	12,02	Sep	0,00
Exp 05 - Superinfec	148,24	129,86	13,21	12,02	Sep	0,00
Exp 05 - Superinfec	148,24	129,86	13,21	12,02	Sep	0,00
Exp 05 - Superinfec	162,03	141,94	14,44	13,14	Sep	0,00
Exp 05 - Superinfec	174,1	152,51	15,51	14,12	Sep	0,00
Exp 05 - Superinfec	198,23	173,65	17,66	16,07	Sep	0,00
Exp 06 - Heparin/Hepar	124,11	108,72	11,06	10,06	Beads	6,83
Exp 06 - Heparin/Hepar	124,11	108,72	11,06	10,06	Beads	6,83
Exp 06 - Heparin/Hepar	124,11	108,72	11,06	10,06	Beads	6,83
Exp 06 - Heparin/Hepar	136,17	119,28	12,13	11,04	Beads	7,31
Exp 06 - Heparin/Hepar	162,03	141,94	14,44	13,14	Beads	8,30
Exp 06 - Heparin/Hepar	198,23	173,65	17,66	16,07	Beads	9,72
Exp 07 - Ativação	124,11	108,72	11,06	10,06	Ader	11,83
Exp 07 - Ativação	148,24	129,86	13,21	12,02	Ader	12,77
Exp 07 - Ativação	148,24	129,86	13,21	12,02	Ader	12,77
Exp 07 - Ativação	162,03	141,94	14,44	13,14	Ader	13,30
Exp 07 - Ativação	174,1	152,51	15,51	14,12	Ader	13,78
Exp 07 - Ativação	198,23	173,65	17,66	16,07	Ader	14,72
Exp 08 - Apop	124,11	108,72	11,06	10,06	Beads	6,83
Exp 08 - Apop	124,11	108,72	11,06	10,06	Beads	6,83
Exp 08 - Apop	148,24	129,86	13,21	12,02	Beads	7,77
Exp 08 - Apop	162,03	141,94	14,44	13,14	Beads	8,30
Exp 08 - Apop	162,03	141,94	14,44	13,14	Beads	8,30
Exp 08 - Apop	162,03	141,94	14,44	13,14	Beads	8,30
Exp 09 - Degra	136,17	119,28	12,13	11,04	Sep	0,00
Exp 09 - Degra	148,24	129,86	13,21	12,02	Sep	0,00
Exp 09 - Degra	148,24	129,86	13,21	12,02	Sep	0,00
Exp 09 - Degra	162,03	141,94	14,44	13,14	Sep	0,00
Exp 09 - Degra	174,1	152,51	15,51	14,12	Sep	0,00
Exp 09 - Degra	186,16	163,08	16,59	15,09	Sep	0,00
Exp 10 - EML	124,11	108,72	11,06	10,06	Ader	11,83
Exp 10 - EML	136,17	119,28	12,13	11,04	Ader	12,31
Exp 10 - EML	136,17	119,28	12,13	11,04	Ader	12,31
Exp 10 - EML	148,24	129,86	13,21	12,02	Ader	12,77
Exp 10 - EML	162,03	141,94	14,44	13,14	Ader	13,30
Exp 10 - EML	162,03	141,94	14,44	13,14	Ader	13,30
Exp 11 - Prime	124,11	108,72	11,06	10,06	Ader	11,83
Exp 11 - Prime	136,17	119,28	12,13	11,04	Ader	12,31
Exp 11 - Prime	148,24	129,86	13,21	12,02	Ader	12,77
Exp 11 - Prime	162,03	141,94	14,44	13,14	Ader	13,30
Exp 11 - Prime	174,1	152,51	15,51	14,12	Ader	13,78
Exp 11 - Prime	210,29	184,21	18,74	17,05	Ader	15,19

8.3 Anexo III – Autorização do CEP



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 01 de outubro de 2009.

Carta: 090/09

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos e
- Dr. Samuel Goldenberg

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **514/09** intitulado “**Vírus da Dengue: Caracterização genética, identificação de assinaturas moleculares de virulência e resposta do hospedeiro humano à infecção**” com a deliberação de **Aprovado**.

Atenciosamente

Carla Dias Netto
Secretária Geral
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815
e-mail: etica@fiocruz.br

Immature Dendritic Cells Generated from Cryopreserved Human Monocytes Show Impaired Ability to Respond to LPS and to Induce Allogeneic Lymphocyte Proliferation

Guilherme Ferreira Silveira¹, Priscilla Fanini Wolk^{1,2}, Anália Maria Breckenfeld Machado³, Claudia Nunes Duarte dos Santos^{1*}, Juliano Bordignon^{1*}

1 Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Curitiba, Paraná, Brasil, **2** Laboratório de Regulação da Expressão Gênica, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Curitiba, Paraná, Brasil, **3** Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná – Divisão de Produção, Curitiba, Paraná, Brasil

Abstract

Dendritic cells play a key role in the immune system, in the sensing of foreign antigens and triggering of an adaptive immune response. Cryopreservation of human monocytes was investigated to understand its effect on differentiation into immature monocyte-derived dendritic cells (imDCs), the response to inflammatory stimuli and the ability to induce allogeneic lymphocyte proliferation. Cryopreserved (crp)-monocytes were able to differentiate into imDCs, albeit to a lesser extent than freshly (frh)-obtained monocytes. Furthermore, crp-imDCs had lower rates of maturation and cytokine/chemokine secretion in response to LPS than frh-imDCs. Lower expression of Toll-like receptor 4 (at 24 and 48 h) and higher susceptibility to apoptosis in crp-imDCs than in fresh cells would account for the impaired maturation and cytokine/chemokine secretion observed. A mixed leukocyte reaction showed that lymphocyte proliferation was lower with crp-imDCs than with frh-imDCs. These findings suggested that the source of monocytes used to generate human imDCs could influence the accuracy of results observed in studies of the immune response to pathogens, lymphocyte activation, vaccination and antigen sensing. It is not always possible to work with freshly isolated monocytes but the possible effects of freezing/thawing on the biology and responsiveness of imDCs should be taken into account.

Citation: Silveira GF, Wolk PF, Machado AMB, dos Santos CND, Bordignon J (2013) Immature Dendritic Cells Generated from Cryopreserved Human Monocytes Show Impaired Ability to Respond to LPS and to Induce Allogeneic Lymphocyte Proliferation. PLoS ONE 8(7): e71291. doi:10.1371/journal.pone.0071291

Editor: Silke Appel, University of Bergen, Norway

Received: September 26, 2012; **Accepted:** June 28, 2013; **Published:** July 31, 2013

Copyright: © 2013 Silveira 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: Financial support was obtained from Fiocruz, CNPq National Counsel of Technological and Scientific Development(477203/2009-4 and 552258/2011-3) and Fundação Araucária (18707/2010). 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: cnsantos@tecpar.br (CNDdS); julianobordignon@fiocruz.br (JB)

Introduction

Dendritic cells (DC), which were first described in 1973 [1], are a major component of the immune system. They are involved in the sensing of foreign antigens and the processing and presenting of antigens to lymphocytes. DCs are the main antigen-presenting cells (APC) in the immune system, bridging the gap between adaptive and innate immune responses [2]. For these reasons, DCs are often the cells chosen to study the pathogenesis of diseases caused by infectious agents, vaccine responses, cancers and autoimmune diseases [3–8]. Additional functions of DCs, such as the control of lymphocyte migration to lymph nodes [9], show their wide relevance to immunology. Dendritic cell-based immunotherapy against cancer has attracted considerable attention in recent years and has increased the importance of this cell type in medicine and basic science [7].

Blood monocytes (CD14⁺) are the major source of human DCs *in vitro*. Their differentiation into DCs (immature monocyte-derived dendritic cells or imDCs) can be induced *in vitro* by interleukin-4 (IL-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [10]. Cryopreservation of CD14⁺ cells is important when studying rare samples, for analyzing cells collected in areas without laboratory facilities and to avoid multiple sampling of the same patient. Methods for isolating and

cryopreserving CD14⁺ cells from human blood have been described and standardized [7,11]. However, there have been conflicting reports concerning the effects of cryopreservation on monocyte differentiation, the response to antigens and the allogeneic stimulation of T cells [11–14].

Given the crucial role of DCs in the immune system regulation and their response to pathogens, evaluating the effect of cryopreservation on these cells is relevant. The freezing and thawing of human monocytes was investigated to understand if it had any effect on cell differentiation, the response to inflammatory stimuli, cell survival or lymphocyte proliferation. Cryopreserved (crp)-monocytes differentiated into immature-imDCs (crp-imDCs) at a lower frequency and displayed lower rates of maturation and cytokine secretion in response to LPS than freshly obtained (frh)-imDCs. The reduced differentiation of crp-CD14⁺ to imDCs could be explained by the lower expression of GM-CSF and IL-4 receptors on crp-CD11c⁺ during differentiation. The impaired response of crp-imDCs to LPS may be explained by the lower TLR4 expression and increased susceptibility to apoptosis. Crp-imDCs were also less able to induce allogeneic lymphocyte proliferation than frh-imDCs.

DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE UM SOFTWARE LIVRE PARA O GERENCIAMENTO DE UM BIOTÉRIO BRASILEIRO

Giovanny Augusto Camacho Antevero Mazzarotto^{1,2}
Guilherme Ferreira Silveira¹

1. Laboratório de Virologia Molecular - Fiocruz/PR, Curitiba, Brasil
2. Biotério, Instituto Carlos Chagas - Fiocruz/PR, Curitiba, Brasil.

Autor para correspondência:
Guilherme Ferreira Silveira
E-mail: gfsilveira@gmail.com

Recebido para publicação: 07 de junho de 2013
Aceito para publicação: 02 de julho de 2013

Com o advento da promulgação da Lei 11794/2008 (Lei Arouca), posteriormente regulamentada pelo Decreto 6899/2009, iniciou-se uma corrida para a implementação de mudanças no cenário da experimentação animal no Brasil, com ênfase para a necessidade de melhorias no gerenciamento dos biotérios. Com o intuito de facilitar essas melhorias, o uso de softwares específicos para o gerenciamento de biotérios tornou-se uma opção atrativa para a manutenção e recuperação dos dados das diferentes rotinas do criatório animal. Estes programas proporcionam melhor visualização da alocação dos recursos financeiros e facilitam tomadas de decisões gerenciais mais rápidas e seguras. Com o objetivo de melhorar a capacidade do processo gerencial do nosso biotério, desenvolvemos e implementamos um software baseado em linguagens de acesso livre, denominado BioterC. As etapas de desenvolvimento e implementação do software foram fundamentadas na interação direta entre o desenvolvedor e os biotéristas, propiciando a construção de uma ferramenta robusta, versátil, de uso intuitivo, em um conceito de elevada adaptabilidade e flexibilidade, sem qualquer investimento adicional com hardware por parte do biotério. Uma vez colocado em uso, o programa pôde ser posteriormente adaptado, visando à adequação do software com a realidade apresentada na rotina de cada ambiente do biotério. No presente relatório técnico descrevemos o desenvolvimento e a implementação de um software baseado em linguagens de programação de acesso livre, utilizado como uma ferramenta gerencial aplicada a biotérios.

Palavras-chave: Biotério. Software livre. BioterC.

RESUMO

1 INTRODUÇÃO

Situação atual do gerenciamento dos biotérios brasileiros

Após a promulgação da Lei 11794/2008 (Lei Arouca), que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, o Brasil ganhou um alicerce sólido na Ciência de Animais de Laboratório (CAL). Antes da referida lei, este ramo da ciência foi dominado por um vácuo

jurídico-regulatório que perdurou por décadas. Com a regulamentação da referida lei através do Decreto 6899/2009, surgiu a necessidade da implementação de mudanças em muitos biotérios do Brasil, com destaque para a necessidade de melhorias no controle gerencial. Este controle gerencial possibilita o aumento da rastreabilidade da produção de animais em termos qualitativos e quantitativos, além de uma visão mais ampla e transparente dos demais processos produtivos que acontecem dentro do biotério. Adicionalmente, o controle gerencial, quando bem executado, pode

Review

Dendritic Cell Apoptosis and the Pathogenesis of Dengue

Sharon de T. Martins ^{1,2}, Guilherme F. Silveira ¹, Lysangela R. Alves ²,
Claudia Nunes Duarte dos Santos ^{1,*} and Juliano Bordignon ^{1,*}

¹ Laboratory of Molecular Virology of the Carlos Chagas Institute, ICC/Fiocruz, Prof. Algacyr Munhoz Mader Street 3775, CIC, Curitiba, Paraná, 81350-010, Brazil;
E-Mails: sth_martins@yahoo.com.br (S.T.M.); gfsilveira@gmail.com (G.F.S.)

² Laboratory of Gene Expression Regulation of the Carlos Chagas Institute, ICC/Fiocruz, Prof. Algacyr Munhoz Mader Street 3775, CIC, Curitiba, Paraná, 81350-010, Brazil;
E-Mail: lys.alves@tecpa.br

* Authors to whom correspondence should be addressed: E-Mails: clsantos@tecpa.br (C.N.D.d.S.)
julianobordignon@fiocruz.br (J.B.); Tel.: +55-41-3316-3242; Fax: +55-41-3316-3267.

Received: 12 October 2012; in revised form: 30 October 2012 / Accepted: 31 October 2012 /
Published: 1 November 2012

Abstract: Dengue viruses and other members of the *Flaviviridae* family are emerging human pathogens. Dengue is transmitted to humans by *Aedes aegypti* female mosquitoes. Following infection through the bite, cells of the hematopoietic lineage, like dendritic cells, are the first targets of dengue virus infection. Dendritic cells (DCs) are key antigen presenting cells, sensing pathogens, processing and presenting the antigens to T lymphocytes, and triggering an adaptive immune response. Infection of DCs by dengue virus may induce apoptosis, impairing their ability to present antigens to T cells, and thereby contributing to dengue pathogenesis. This review focuses on general mechanisms by which dengue virus triggers apoptosis, and possible influence of DC-apoptosis on dengue disease severity.

Keywords: Dendritic cell; apoptosis; dengue virus

9 BIBLIOGRAFIA

ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Differential requirements in endocytic trafficking for penetration of dengue virus. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44835, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

ACOSTA, P. O. et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 10, p. 1979-80; author's reply 1980-1, Oct 2011. ISSN 1080-6059 (Electronic)

ALEYAS, A. G. et al. Impaired cross-presentation of CD8 α + CD11c+ dendritic cells by Japanese encephalitis virus in a TLR2/MyD88 signal pathway-dependent manner. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 10, p. 2655-66, Oct 2012. ISSN 1521-4141 (Electronic)

ALFONZO, M. et al. [Altered expression of survival (CD127) and death (Fas) receptors in total, naive and memory CD8 T lymphocytes from human immunodeficiency virus infected patients: possible implications for progression of infection]. **Invest Clin**, v. 49, n. 2, p. 151-68, Jun 2008. ISSN 0535-5133 (Print)

ANDERSON, K. B. et al. Preexisting Japanese encephalitis virus neutralizing antibodies and increased symptomatic dengue illness in a school-based cohort in Thailand. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 10, p. e1311, Oct 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

APPANNA, R. et al. Cross-reactive T-cell responses to the nonstructural regions of dengue viruses among dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Malaysia. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 8, p. 969-77, Aug 2007. ISSN 1556-6811 (Print)

ASHOUR, J. et al. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **J Virol**, v. 83, n. 11, p. 5408-18, Jun 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic)

AVIRUTNAN, P. et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis**, v. 193, n. 8, p. 1078-88, Apr 15 2006. ISSN 0022-1899 (Print)

AZEREDO, E. L. et al. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. **Clin Exp Immunol**, v. 143, n. 2, p. 345-56, Feb 2006. ISSN 0009-9104 (Print)

AZEREDO, E. L. et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. **Immunobiology**, v. 204, n. 4, p. 494-507, Dec 2001. ISSN 0171-2985 (Print)

BADE, B. et al. Detection of soluble human granzyme K in vitro and in vivo. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 10, p. 2940-8, Oct 2005. ISSN 0014-2980 (Print)

BAO, X. et al. Endothelial heparan sulfate controls chemokine presentation in recruitment of lymphocytes and dendritic cells to lymph nodes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 817-29, Nov 24 2010. ISSN 1097-4180 (Electronic)

BARNES, W. J.; ROSEN, L. Fatal hemorrhagic disease and shock associated with primary dengue infection on a Pacific island. **Am J Trop Med Hyg**, v. 23, n. 3, p. 495-506, May 1974. ISSN 0002-9637 (Print)

BEATTY, M. E. et al. Health economics of dengue: a systematic literature review and expert panel's assessment. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, n. 3, p. 473-88, Mar 2011. ISSN 1476-1645 (Electronic)

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr 25 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)

BIELEFELDT-OHMANN, H. et al. Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. **Virus Res**, v. 73, n. 1, p. 81-9, Jan 2001. ISSN 0168-1702 (Print)

BLACKLEY, S. et al. Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus infection in vitro. **J Virol**, v. 81, n. 24, p. 13325-34, Dec 2007. ISSN 1098-5514 (Electronic)

BOKISCH, V. A. et al. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. **N Engl J Med**, v. 289, n. 19, p. 996-1000, Nov 8 1973. ISSN 0028-4793 (Print)

BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic)

CARDIER, J. E. et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. **Cytokine**, v. 30, n. 6, p. 359-65, Jun 21 2005. ISSN 1043-4666 (Print)

CASALS, J.; BROWN, L. V. Hemagglutination with certain arthropod-borne viruses. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 83, n. 1, p. 170-3, May 1953. ISSN 0037-9727 (Print)

_____. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. **J Exp Med**, v. 99, n. 5, p. 429-49, May 1 1954. ISSN 0022-1007 (Print)

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol**, v. 44, p. 649-88, 1990. ISSN 0066-4227 (Print)

CHASE, A. J.; MEDINA, F. A.; MUNOZ-JORDAN, J. L. Impairment of CD4+ T cell polarization by dengue virus-infected dendritic cells. **J Infect Dis**, v. 203, n. 12, p. 1763-74, Jun 15 2011. ISSN 1537-6613 (Electronic)

- CHATURVEDI, U. C. Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. **Indian J Med Res**, v. 129, p. 3, 1999.
- CHATURVEDI, U. C. et al. Shift from a Th1-type response to Th2-type in Dengue haemorrhagic fever. **Curr Sci**, v. 76, n. 01, p. 9, 1999.
- CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nat Med**, v. 3, n. 8, p. 866-71, Aug 1997. ISSN 1078-8956 (Print)
- CLARK, G. G. et al. Identification of *Aedes campestris* from New Mexico: with notes on the isolation of western equine encephalitis and other arboviruses. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 2, n. 4, p. 529-34, Dec 1986. ISSN 8756-971X (Print)
- DALRYMPLE, N.; MACKOW, E. R. Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. **J Virol**, v. 85, n. 18, p. 9478-85, Sep 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic)
- DEJNIRATTISAI, W. et al. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. **J Immunol**, v. 181, n. 9, p. 5865-74, Nov 1 2008. ISSN 1550-6606 (Electronic)
- DESPRES, P.; FRENKIEL, M. P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, v. 196, n. 1, p. 209-19, Sep 1993. ISSN 0042-6822 (Print)
- DIAMOND, M. S. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. **Immunol Cell Biol**, v. 81, n. 3, p. 196-206, Jun 2003. ISSN 0818-9641 (Print)
- DUARTE DOS SANTOS, C. N. et al. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virology**, v. 274, n. 2, p. 292-308, Sep 1 2000. ISSN 0042-6822 (Print)
- ESPINA, L. M. et al. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, n. 1, p. 48-53, Jan 2003. ISSN 0002-9637 (Print)
- FAGUNDES, C. T. et al. IFN- γ Production Depends on IL-12 and IL-18 Combined Action and Mediates Host Resistance to Dengue Virus Infection in a Nitric Oxide-Dependent Manner. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, p. e1449, 2011. ISSN 1935-2735.
- FLORINS, A. et al. Viral expression directs the fate of B cells in bovine leukemia virus-infected sheep. **J Virol**, v. 86, n. 1, p. 621-4, Jan 2012. ISSN 1098-5514 (Electronic)

- FUSE, S. et al. Recall responses by helpless memory CD8+ T cells are restricted by the up-regulation of PD-1. **J Immunol**, v. 182, n. 7, p. 4244-54, Apr 1 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)
- GAGNON, S. J.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. **J Virol**, v. 73, n. 5, p. 3623-9, May 1999. ISSN 0022-538X (Print)
- GERMI, R. et al. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology**, v. 292, n. 1, p. 162-8, Jan 5 2002. ISSN 0042-6822 (Print)
- GIBBONS, R. V. et al. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 5, p. 910-3, Nov 2007. ISSN 1476-1645 (Electronic)
- GOULD, E. A.; CLEGG, J. C. S. Growth, titration and purification of Togaviruses. In: MAHY, B. W. J. (Ed.). **Virology: a practical approach**. Washington, DC, 1985.
- GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. **Trop Med Health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 3-11, Dec 2011. ISSN 1349-4147 (Electronic)
- _____. The economic burden of dengue. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 5, p. 743-4, May 2012. ISSN 1476-1645 (Electronic)
- GUTIERREZ-SANMARTIN, D. et al. Implication of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms (alpha, beta, gamma and delta) in CD4+ T-cell infection with human immunodeficiency virus type I. **J Gen Virol**, v. 89, n. Pt 7, p. 1661-71, Jul 2008. ISSN 0022-1317 (Print)
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, Dec 2010. ISSN 1740-1534 (Electronic)
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue 2 virus enhancement in asthmatic and non asthmatic individual. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 4, p. 559-64, Oct-Dec 1992. ISSN 0074-0276 (Print)
- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-81, Jan 29 1988. ISSN 0036-8075 (Print)
- HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **J Exp Med**, v. 146, n. 1, p. 201-17, Jul 1 1977. ISSN 0022-1007 (Print)
- HALSTEAD, S. B.; PORTERFIELD, J. S.; O'ROURKE, E. J. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. **Am J Trop Med Hyg**, v. 29, n. 4, p. 638-42, Jul 1980. ISSN 0002-9637 (Print)

- HANSEN, S. J. et al. Cowpox virus inhibits human dendritic cell immune function by nonlethal, nonproductive infection. **Virology**, v. 412, n. 2, p. 411-25, Apr 10 2011. ISSN 1096-0341 (Electronic)
- HENCHAL, E. A. et al. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **Am J Trop Med Hyg**, v. 31, n. 4, p. 830-6, Jul 1982. ISSN 0002-9637 (Print)
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clin Microbiol Rev**, v. 3, n. 4, p. 376-96, Oct 1990. ISSN 0893-8512 (Print)
- HILGARD, P.; STOCKERT, R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. **Hepatology**, v. 32, n. 5, p. 1069-77, Nov 2000. ISSN 0270-9139 (Print)
- HIRSCH, R. L. et al. Measles virus vaccination of measles seropositive individuals suppresses lymphocyte proliferation and chemotactic factor production. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 21, n. 3, p. 341-50, Dec 1981. ISSN 0090-1229 (Print)
- HO, L. J. et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. **J Immunol**, v. 166, n. 3, p. 1499-506, Feb 1 2001. ISSN 0022-1767 (Print)
- HOFMANN, M. et al. T cell avidity determines the level of CTL activation. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 7, p. 1798-806, Jul 2004. ISSN 0014-2980 (Print)
- HOMCHAMPA, P. et al. Natural killer cells in dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 6, n. 2, p. 95-102, Dec 1988. ISSN 0125-877X (Print)
- HUANG, C. Y. et al. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. **Virology**, v. 396, n. 2, p. 305-15, Jan 20 2010. ISSN 1096-0341 (Electronic)
- HUNG, C. M. et al. Porcine lactoferrin administration enhances peripheral lymphocyte proliferation and assists infectious bursal disease vaccination in native chickens. **Vaccine**, v. 28, n. 16, p. 2895-902, Apr 1 2010. ISSN 1873-2518 (Electronic)
- IBRAHIM, J. et al. Cell-surface heparan sulfate facilitates human immunodeficiency virus Type 1 entry into some cell lines but not primary lymphocytes. **Virus Res**, v. 60, n. 2, p. 159-69, Apr 1999. ISSN 0168-1702 (Print)
- IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. **J Gen Virol**, v. 40, n. 3, p. 531-44, Sep 1978. ISSN 0022-1317 (Print)
- IMRIE, A. et al. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. **J Virol**, v. 81, n. 18, p. 10081-91, Sep 2007. ISSN 0022-538X (Print)

ITO, Y. et al. Identification of Epstein-Barr virus-infected CD27+ memory B-cells in liver or stem cell transplant patients. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 11, p. 2590-5, Nov 2011. ISSN 1465-2099 (Electronic)

JAIN, A. et al. IL-17 level in patients with Dengue virus infection & its association with severity of illness. **J Clin Immunol**, v. 33, n. 3, p. 613-8, Apr 2013. ISSN 1573-2592 (Electronic)

JOVANOVIC, D. V. et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. **J Immunol**, v. 160, n. 7, p. 3513-21, Apr 1998. ISSN 0022-1767 (Print)

KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S. Is dengue severity related to nutritional status? **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 36, n. 2, p. 378-84, Mar 2005. ISSN 0125-1562 (Print)

KANEGANE, H. et al. A syndrome of peripheral blood T-cell infection with Epstein-Barr virus (EBV) followed by EBV-positive T-cell lymphoma. **Blood**, v. 91, n. 6, p. 2085-91, Mar 15 1998. ISSN 0006-4971 (Print)

KELSALL, B. L. et al. Dendritic cells at the host-pathogen interface. **Nat Immunol**, v. 3, n. 8, p. 699-702, Aug 2002. ISSN 1529-2908 (Print)

KING, A. D. et al. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 30, n. 4, p. 718-28, Dec 1999. ISSN 0125-1562 (Print)

KLOMPORN, P. et al. Dengue infection of monocytic cells activates ER stress pathways, but apoptosis is induced through both extrinsic and intrinsic pathways. **Virology**, v. 409, n. 2, p. 189-97, Jan 20 2011. ISSN 1096-0341 (Electronic)

KONG, X. et al. Effects of Chinese herbal medicinal ingredients on peripheral lymphocyte proliferation and serum antibody titer after vaccination in chicken. **Int Immunopharmacol**, v. 4, n. 7, p. 975-82, Jul 2004. ISSN 1567-5769 (Print)

KONTTINEN, Y. T.; BLUESTEIN, H. G.; ZVAIFLER, N. J. Regulation of the growth of Epstein-Barr virus-infected B cells. I. Growth regression by E rosetting cells from VCA-positive donors is a combined effect of autologous mixed leukocyte reaction and activation of T8+ memory cells. **J Immunol**, v. 134, n. 4, p. 2287-93, Apr 1985. ISSN 0022-1767 (Print)

KOU, Z. 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**, v. 80, n. 1, p. 134-46, Jan 2008. ISSN 0146-6615 (Print)

KUMAR, Y. et al. Serum proteome and cytokine analysis in a longitudinal cohort of adults with primary dengue infection reveals predictive markers of DHF. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 11, p. e1887, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic)

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus Flavivirus. **J Virol**, v. 72, n. 1, p. 73-83, Jan 1998. ISSN 0022-538X (Print)

KURANE, I.; ENNIS, F. A. Induction of interferon alpha from human lymphocytes by autologous, dengue virus-infected monocytes. **J Exp Med**, v. 166, n. 4, p. 999-1010, Oct 1 1987. ISSN 0022-1007 (Print)

KURANE, I. et al. Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. **J Virol**, v. 52, n. 1, p. 223-30, Oct 1984. ISSN 0022-538X (Print)

KURANE, I.; HEBBLEWAITE, D.; ENNIS, F. A. Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. **Immunology**, v. 58, n. 3, p. 429-36, Jul 1986. ISSN 0019-2805 (Print)

KURANE, I. et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. **J Clin Invest**, v. 88, n. 5, p. 1473-80, Nov 1991. ISSN 0021-9738 (Print)

KURANE, I. et al. Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gamma production. **J Clin Invest**, v. 83, n. 2, p. 506-13, Feb 1989. ISSN 0021-9738 (Print)

KURANE, I. et al. Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. **Arch Virol**, v. 110, n. 1-2, p. 91-101, 1990. ISSN 0304-8608 (Print)

KUTUBUDDIN, M. et al. Recognition of helper T cell epitopes in envelope (E) glycoprotein of Japanese encephalitis, west Nile and Dengue viruses. **Mol Immunol**, v. 28, n. 1-2, p. 149-54, Jan-Feb 1991. ISSN 0161-5890 (Print)

LASKUS, T. et al. Effect of hepatitis C infection on HIV-induced apoptosis. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75921, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

LIMONTA, D. et al. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. **J Clin Virol**, v. 40, n. 1, p. 50-4, Sep 2007. ISSN 1386-6532 (Print)

LIMONTA, D. et al. Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient. **Diab Vasc Dis Res**, v. 5, n. 3, p. 213-4, Sep 2008. ISSN 1479-1641 (Print)

LIN, C. F. et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **J Med Virol**, v. 69, n. 1, p. 82-90, Jan 2003. ISSN 0146-6615 (Print)

LIN, Y. W. et al. Virus Replication and Cytokine Production in Dengue Virus-Infected Human B Lymphocytes. **Journal of Virology**, v. 76, n. 23, p. 12242-12249, 2002. ISSN 0022-538X.

LIU, H. et al. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 665-75, Nov 2000. ISSN 1074-7613 (Print)

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print)

MALASIT, P. Complement and dengue haemorrhagic fever/shock syndrome. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 18, n. 3, p. 316-20, Sep 1987. ISSN 0125-1562 (Print)

MALAVIGE, G. N. et al. Dengue viral infections. **Postgrad Med J**, v. 80, n. 948, p. 588-601, Oct 2004. ISSN 0032-5473 (Print)

MALAVIGE, G. N. et al. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. **BMC Infect Dis**, v. 13, n. 1, p. 341, 2013. ISSN 1471-2334 (Electronic)

MANEEKAN, P. et al. T helper (Th) 1 and Th2 cytokine expression profile in dengue and malaria infection using magnetic bead-based bio-plex assay. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 44, n. 1, p. 31-6, Jan 2013. ISSN 0125-1562 (Print)

MANGADA, M. M.; ROTHMAN, A. L. Altered Cytokine Responses of Dengue-Specific CD4+ T Cells to Heterologous Serotypes. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 4, p. 8, 2005.

MARTINEZ, E. et al. [Dengue fever and hemorrhagic dengue in infants with a primary infection]. **Rev Cubana Med Trop**, v. 45, n. 2, p. 97-101, 1993. ISSN 0375-0760 (Print)

MATHEW, A. et al. Impaired T cell proliferation in acute dengue infection. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5609-15, May 1 1999. ISSN 0022-1767 (Print)

MENTOR, N. A.; KURANE, I. Dengue virus infection of human T lymphocytes. **Acta Virol**, v. 41, n. 3, p. 175-6, Jun 1997. ISSN 0001-723X (Print)

MOESKER, F. M. et al. Fatal dengue in patients with sickle cell disease or sickle cell anemia in Curacao: two case reports. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2203, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic)

MOLE, B. M. **Antibody-Dependent Enhanced (ADE) Immunity** 2013.

MONATH, T. P. et al. Multisite monoclonal immunoassay for dengue viruses: detection of viraemic human sera and interference by heterologous antibody. **J Gen Virol**, v. 67 (Pt 4), p. 639-50, Apr 1986. ISSN 0022-1317 (Print)

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nat Med**, v. 9, n. 7, p. 921-7, Jul 2003. ISSN 1078-8956 (Print)

- MONGKOLSAPAYA, J. et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? **J Immunol**, v. 176, n. 6, p. 3821-9, Mar 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print)
- MORAN, E. et al. Preservation of a critical epitope core region is associated with the high degree of flaviviral cross-reactivity exhibited by a dengue-specific CD4+ T cell clone. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 4, p. 1050-7, Apr 2008. ISSN 0014-2980 (Print)
- MUNOZ-JORDAN, J. L. et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **J Virol**, v. 79, n. 13, p. 8004-13, Jul 2005. ISSN 0022-538X (Print)
- MUNOZ-JORDAN, J. L. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 24, p. 14333-8, Nov 25 2003. ISSN 0027-8424 (Print)
- MUSTAFA, A. S. et al. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 30, n. 3, p. 229-33, Apr 2001. ISSN 0928-8244 (Print)
- MYINT, K. S. et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. **J Infect Dis**, v. 194, n. 5, p. 600-7, Sep 1 2006. ISSN 0022-1899 (Print)
- NAKAO, M. et al. Studies on the subpopulation and function of peripheral lymphocytes, and inhibitor to PHA stimulation existing in the serum of patients with liver disease. **Gastroenterol Jpn**, v. 10, n. 4, p. 307-15, 1975. ISSN 0435-1339 (Print)
- NAVARRO-SANCHEZ, E. 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**, v. 4, n. 7, p. 723-8, Jul 2003. ISSN 1469-221X (Print)
- NAVARRO-SANCHEZ, E.; DÈSPRES, P.; CEDILLO-BARRON, L. Innate immune responses to dengue virus. **Arch Med Res**, v. 36, n. 5, p. 425-35, Sep-Oct 2005. ISSN 0188-4409 (Print)
- NGUYEN, T. H. et al. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg**, v. 72, n. 4, p. 370-4, Apr 2005. ISSN 0002-9637 (Print)
- NIELSEN, D. G. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. **Virol J**, v. 6, p. 211, 2009. ISSN 1743-422X (Electronic)
- NIGAM, P. et al. Loss of IL-17-producing CD8 T cells during late chronic stage of pathogenic simian immunodeficiency virus infection. **J Immunol**, v. 186, n. 2, p. 745-53, Jan 15 2011. ISSN 1550-6606 (Electronic)

NOGUEIRA, M. B. et al. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 483-8, Aug 2008. ISSN 1678-8060 (Electronic)

NORMILE, D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415, Oct 25 2013. ISSN 1095-9203 (Electronic)

O'SULLIVAN, M. A.; KILLEN, H. M. The differentiation state of monocytic cells affects their susceptibility to infection and the effects of infection by dengue virus. **J Gen Virol**, v. 75 (Pt 9), p. 2387-92, Sep 1994. ISSN 0022-1317 (Print)

OTHMAN, S.; RAHMAN, N. A.; YUSOF, R. All serotypes of dengue virus induce HLA-A2 major histocompatibility complex class I promoter activity in human liver cells. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 12, p. 806-8, Dec 2010. ISSN 1878-3503 (Electronic)

P.H.O.; W.H.O. **Dados da Dengue no Brasil, 2013** 2013.

PANG, J. et al. Diabetes with hypertension as risk factors for adult dengue hemorrhagic fever in a predominantly dengue serotype 2 epidemic: a case control study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1641, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic)

PANG, T. et al. T cell-mediated cytotoxicity against dengue-infected target cells. **Microbiol Immunol**, v. 32, n. 5, p. 511-8, 1988. ISSN 0385-5600 (Print)

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 369-77, Aug 2008. ISSN 1369-5274 (Print)

PRYOR, M. J. et al. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 5, p. 427-34, Nov 2001. ISSN 0002-9637 (Print)

RAJSBAUM, R.; GARCIA-SASTRE, A.; VERSTEEG, G. A. TRIMmunity: The Roles of the TRIM E3-Ubiquitin Ligase Family in Innate Antiviral Immunity. **J Mol Biol**, Dec 12 2013. ISSN 1089-8638 (Electronic)

RAZVI, E. S.; WELSH, R. M. Programmed cell death of T lymphocytes during acute viral infection: a mechanism for virus-induced immune deficiency. **J Virol**, v. 67, n. 10, p. 5754-65, Oct 1993. ISSN 0022-538X (Print)

REEKE, G. N., JR. et al. Structure and function of concanavalin A. **Adv Exp Med Biol**, v. 55, p. 13-33, 1975. ISSN 0065-2598 (Print)

REYES-DEL VALLE, J. et al. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. **J Virol**, v. 79, n. 8, p. 4557-67, Apr 2005. ISSN 0022-538X (Print)

RIZVI, N.; CHATURVEDI, U. C.; MATHUR, A. Inhibition of the presentation of dengue virus antigen by macrophages to B cells by serine-protease inhibitors. **Int J Exp Pathol**, v. 72, n. 1, p. 23-9, Feb 1991. ISSN 0959-9673 (Print)

ROBICHAUD, G. A. Nuclear Factor of Activated T Cells Is a Driving Force for Preferential Productive HIV-1 Infection of CD45RO-expressing CD4+ T Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 26, p. 23733-23741, 2002. ISSN 00219258

RODENHUIS-ZYBERT, I. A. et al. Immature dengue virus: a veiled pathogen? **PLoS Pathog**, v. 6, n. 1, p. e1000718, Jan 2010. ISSN 1553-7374 (Electronic)

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 16, p. 2773-86, Aug 2010. ISSN 1420-9071 (Electronic)

RODRIGUEZ-MADOZ, J. R. et al. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. **J Virol**, v. 84, n. 19, p. 9760-74, Oct 2010. ISSN 1098-5514 (Electronic)

ROEHRIG, J. T. et al. Mutation of the dengue virus type 2 envelope protein heparan sulfate binding sites or the domain III lateral ridge blocks replication in Vero cells prior to membrane fusion. **Virology**, v. 441, n. 2, p. 114-25, Jul 5 2013. ISSN 1096-0341 (Electronic)

ROSEN, L.; DROUET, M. T.; DEUBEL, V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 5, p. 720-4, Nov 1999. ISSN 0002-9637 (Print)

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 946-951, 2004. ISSN 0021-9738.

ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, v. 257, n. 1, p. 1-6, Apr 25 1999. ISSN 0042-6822 (Print)

RUSSELL, P. K.; CHIEWSILP, D.; BRANDT, W. E. Immunoprecipitation analysis of soluble complement-fixing antigens of dengue viruses. **J Immunol**, v. 105, n. 4, p. 838-45, Oct 1970. ISSN 0022-1767 (Print)

S.V.S.; M.S. **Dengue. Sistema de Vigilância Sanitária (SVS), Ministério da Saúde (MS) 2009.**

SAKUNTABHAI, A. et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nat Genet**, v. 37, n. 5, p. 507-13, May 2005. ISSN 1061-4036 (Print)

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J Exp Med**, v. 179, n. 4, p. 1109-18, Apr 1 1994. ISSN 0022-1007 (Print)

- SANGKAWIBHA, N. et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. **Am J Epidemiol**, v. 120, n. 5, p. 653-69, Nov 1984. ISSN 0002-9262 (Print)
- SELIGMAN, S. J. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide. **Virology**, v. 5, p. 27, 2008. ISSN 1743-422X (Electronic)
- SHEPARD, D. S. et al. Economic impact of dengue illness in the Americas. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, n. 2, p. 200-7, Feb 2011. ISSN 1476-1645 (Electronic)
- SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A. Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 2, p. e2055, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic)
- SIERRA, B. et al. HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. **Hum Immunol**, v. 68, n. 6, p. 531-40, Jun 2007. ISSN 0198-8859 (Print)
- SILVEIRA, G. F. 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**, v. 85, n. 11, p. 5374-83, Jun 2011. ISSN 1098-5514 (Electronic)
- SIMMONS, C. P. et al. Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. **J Infect Dis**, v. 196, n. 3, p. 416-24, Aug 1 2007. ISSN 0022-1899 (Print)
- SIMMONS, C. P. et al. Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. **J Virol**, v. 79, n. 9, p. 5665-75, May 2005. ISSN 0022-538X (Print)
- SIQUEIRA, J. B., JR. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 1, p. 48-53, Jan 2005. ISSN 1080-6040 (Print)
- SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue no Brasil: tendencias e mudancas na epidemiologia, com enfase nas epidemias de 2008 e 2010. In: SIQUEIRA, J. B. (Ed.). **Saúde Brasil 2010**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde., 2010. cap. 7, p.372. ISBN 978-85-334-1851-6.
- SOO HOO, W. et al. Vaccination with cell immunoglobulin mucin-1 antibodies and inactivated influenza enhances vaccine-specific lymphocyte proliferation, interferon-gamma production and cross-strain reactivity. **Clin Exp Immunol**, v. 145, n. 1, p. 123-9, Jul 2006. ISSN 0009-9104 (Print)
- ST JOHN, A. L. et al. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 22, p. 9190-5, May 31 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic)

STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 10, p. 5132-6, Oct 1978. ISSN 0027-8424 (Print)

SUN, P. et al. A dendritic cell-based assay for measuring memory T cells specific to dengue envelope proteins in human peripheral blood. **J Virol Methods**, v. 173, n. 2, p. 175-81, May 2011. ISSN 1879-0984 (Electronic)

THISYAKORN, U.; NIMMANNITYA, S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. **Clin Infect Dis**, v. 16, n. 2, p. 295-7, Feb 1993. ISSN 1058-4838 (Print)

TORRENTES-CARVALHO, A. et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1091-9, Dec 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic)

TUCCI, F. A. et al. B cells in chronically hepatitis C virus-infected individuals lack a virus-induced mutation signature in the TP53, CTNNB1, and BCL6 genes. **J Virol**, v. 87, n. 5, p. 2956-62, Mar 2013. ISSN 1098-5514 (Electronic)

TUTT, A. L. et al. Secretion of idiotypic IgM by the mouse B-cell leukaemia (BCL1) occurs spontaneously in vitro and in vivo. **Immunology**, v. 55, n. 1, p. 59-63, May 1985. ISSN 0019-2805 (Print)

UBOL, S.; HALSTEAD, S. B. How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 12, p. 1829-35, Dec 2010. ISSN 1556-679X (Electronic)

VAN, T. H.; WILTERDINK, J. B.; TIMMERS, W. C. Neutralizing antibodies to the viruses of poliomyelitis, dengue types 1 and 2, Murray Valley and Japanese B encephalitis in Papuan populations of Netherlands New Guinea. **Trop Geogr Med**, v. 12, p. 208-16, Sep 1960. ISSN 0041-3232 (Print)

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J Infect Dis**, v. 181, n. 1, p. 2-9, Jan 2000. ISSN 0022-1899 (Print)

W.H.O. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. . In: (Ed.). **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2009. p.160. ISBN 978 92 4 154787 1.

W.H.O. **Dengue and severe dengue: Fact Sheet**. Geneva: World Health Organization (WHO): WHO. 117 2012a.

_____. Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020. **WHO Press**, v. 2012, 2012b.

WEISKOPF, D. et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 22, p. E2046-53, May 28 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic)

WHO. **Dengue and severe dengue**. 2013.

WU, S. J. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat Med**, v. 6, n. 7, p. 816-20, Jul 2000. ISSN 1078-8956 (Print)

XU, X. F. et al. Rab8, a vesicular traffic regulator, is involved in dengue virus infection in HepG2 cells. **Intervirolgy**, v. 51, p. 9, 2008-08-25 2008. ISSN 1423-0100.

YE, J. et al. Immune evasion strategies of flaviviruses. **Vaccine**, v. 31, n. 3, p. 461-71, Jan 7 2013. ISSN 1873-2518 (Electronic)

YU, C. Y. et al. Dengue virus targets the adaptor protein MITA to subvert host innate immunity. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 6, p. e1002780, 2012. ISSN 1553-7374 (Electronic)

ZHUKOVA, O. B. et al. [Modulation of programmed death of the peripheral blood lymphocytes under chronic virus infection]. **Tsitologiya**, v. 49, n. 1, p. 26-31, 2007. ISSN 0041-3771 (Print)