

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**

MARCELA HELENA GONÇALVES PEREIRA DE OLIVEIRA

**MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA DENGUE HUMANA**

Belo Horizonte – MG

2020

MARCELA HELENA GONÇALVES PEREIRA DE OLIVEIRA

**MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA DENGUE HUMANA**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Dr. Helton da Costa Santiago

Coorientadora: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Belo Horizonte – MG

2020

043

Oliveira, Marcela Helena Gonçalves Pereira de.

Mecanismos de regulação da resposta imune na dengue humana  
[manuscrito] / Marcela Helena Gonçalves Pereira de Oliveira. – 2020.  
105 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Helton da Costa Santiago. Coorientadora: Lis Ribeiro do Valle Antonelli.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Dengue. 3. Linfócitos T Reguladores. I. Santiago, Helton da Costa. II. Antonelli, Lis Ribeiro do Valle. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARCELA HELENA GONÇALVES PEREIRA DE OLIVEIRA. Aos trinta dias do mês de março de 2020 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Mecanismos de regulação da resposta imune na dengue humana"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Mauro Martins Teixeira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Andrea Teixeira de Carvalho (Instituto René Rachou - Fiocruz - MG), aprovada; Dr. Marcelo Torres Bozza (Universidade Federal do Rio de Janeiro), aprovada; Dr. Lis Ribeiro do Valle Antonelli - Coorientadora (Instituto René Rachou - Fiocruz -MG), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de março de 2020.

Dr. Mauro Martins Teixeira (UFMG) 

Dr. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG), 

Dr. Andrea Teixeira de Carvalho (Instituto René Rachou - Fiocruz - MG), 

Dr. Marcelo Torres Bozza (Universidade Federal do Rio de Janeiro) 

Dr. Lis Ribeiro do Valle Antonelli - Coorientadora (Instituto René Rachou - Fiocruz -MG) 

Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG) 

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus! Com Ele vivo uma vida proporcionada de coincidências divinas. Neste momento é inevitável a nostalgia que sinto ao lembrar todos os caminhos que percorri para chegar até aqui. Mesmo as experiências que podem parecer não ter contribuído, todas de certo modo me trouxeram até este momento. E sempre acompanhada de muito amor ao meu redor. Aos meus pais, Rosa e Hélis, por todo amor dado a mim desde o meu nascimento. Agradeço ao meu irmão, Juninho, por completar nossa família com seu enorme coração e a Andreza minha linda cunhada e amiga. Ao Alex por ser meu companheiro, amigo e família.

Tive grande incentivo de professoras ao longo dos anos de escola pública. No fundamental I agradeço a professora Vânia por me ensinar a ser “bicho grilo” desde pequena e valorizar acima de tudo a natureza. Na sétima série, a professora Janice que me proporcionou o primeiro contato com a ciência, com ela me encantei por nomes grandes e difíceis, aprendi sistemas do corpo humano, mas o auge foi a aula prática na bancada da cantina, na qual abrimos galinhas e peixes para estudar os órgãos! Muito obrigada a Vânia e Janice!

No ensino médio tive a grande oportunidade de ser bolsista integral, no período noturno, em um grande colégio particular, mesmo com o deslocando de ônibus de Santa Luzia até Savassi, sabia que era a esperança de ter a oportunidade de fazer faculdade. Além disso, nossa que estrutura! Tinha laboratório de biologia, física, química, até de informática. Sem dúvidas poder participar de uma viagem com intuito de estudar biologia marinha e ver ao vivo em um microscópio as divisões celulares até chegar à mórula foi sensacional! Era biologia que queria. Definitivamente.

Mas a família queria um curso rentável. E aí o sonho acabou, pois não passei em engenharia ambiental na UFMG. Ou, na verdade, o sonho era mais valoroso que qualquer salário, pois saíram os resultados de bolsa integral em Faculdades particulares e então fiz minha linda Biomedicina.

Na faculdade, a professora Paula de bioquímica me incentivou a fazer iniciação científica na UFMG, neste departamento, mas não foi possível por incompatibilidade de horário, já que trabalhava para pagar os custos de se fazer faculdade e deslocamento. Mas no sexto período, procurei meu professor de biomol para fazer iniciação científica com ele, foi desanimador e frustrante tudo que ele me disse. A chama se apagava.

E então veio o estágio na FUNED, no setor de virologia, laboratório de Dengue e Febre Amarela. Agradeço as minhas chefes Jacqueline e Mara, a minha tutora de bancada Simone, aprendi muito sobre biossegurança, qualidade e respeito a cada uma das amostras (de vida) que testávamos. Meu estágio obrigatório estava no fim, a chama também. Foi quando, na última semana de estágio, Deus proporcionou o encontro do professor Helton com a Jacqueline. Então, agradeço a Jacque por inesperadamente me indicar ao professor Helton.

Agradeço ao professor e orientador Helton, por estes sete anos de lab! São meus primeiros anos na ciência. Muito obrigada pela oportunidade, por literalmente se sentar ao meu lado e me ensinar a ler artigo (e agora temos o nosso!), por ir para bancada comigo, por acreditar em mim inúmeras vezes em que eu duvidei da minha capacidade. Pela coragem em me aceitar, por ter muita paciência comigo, por me preparar para o mestrado, por me obrigar a enfrentar meus medos, por permitir meus erros, enfim por toda ajuda. Agradeço por me aceitar no seu Lab, pois a porta que você me abriu fez da minha vida profissional muito feliz e com um gostinho especial de sonho sendo realizado. Muito obrigada por tudo! Agradeço a Lucélia, Gabrielle e Janaína, que me ajudaram nas primeiras coletas e processamentos de amostras. Suemara, Rafael Pascoalino, Tainara, Taísa, Daianny, Amanda e Naysa que me ajudaram nos primeiros experimentos da dengue, muito obrigada! As meninas Lorraine e Maria que eram companheiras de lab. Agradeço também ao Rafael e Letícia que ajudavam na organização do lab. Agradeço a Ester por ter ficado um pouquinho com a gente no lab e deixar o ambiente mais leve, calmo e carinhoso, por corrigir meus erros de português e inglês, por levar bolo de mandioca quentinho e cupcakes deliciosos. Agradeço a Camila, uma grande amiga e companheira, por me ajudar nas apresentações orais, em longos experimentos de citometria, por revisar meus trabalhos, por estar sempre disponível e pronta para colaborar. Agradeço a Laila, Michele, Iracema por me ajudarem nas coletas e processamento de sangue, foram epidemias que nos exauriam, mas compensávamos com Uai Pasta e muitas risadas. Agradeço pelo lab ter crescido e assim conhecer Stephanie, Gregório, Tertuliano, Javier, Mariana, Rafaela, Leo, Gabriela, Tyfani, vocês tornaram este lab uma grande família! E obrigada por todas as ajudas diárias!

A minha coorientadora Lis, por me instruir durante os complexos procedimentos de bancada, de aquisição, e nas difíceis análises criteriosas da citometria de fluxo. Muito obrigada por ser minha referência de uma Citometria de Fluxo de excelência! Agradeço a Martinha por ser meu braço direito na Fiocruz, e ser meu anjo na execução dos meus primeiros experimentos de CBA e

Citometria de Fluxo, sua ajuda foi indispensável para minha jornada. Muito obrigada! Agradeço a generosidade da Suelen, do Pedro e do Bruno Galvão, que estiveram comigo no início. A Tiza e a Lorena da Plataforma de Citometria de Fluxo da Fiocruz, por me ajudarem durante as longas aquisições, me deixando fazer pausas para lanchinhos.

Agradeço, então, a todos os voluntários que consentiram em participar deste trabalho, em especial os pacientes que mesmo em um momento tão delicado, de saúde frágil, e com medo da evolução da doença, aceitaram participar deste projeto. Assim, graças a confiança e fé destas pessoas nas pesquisas que são realizadas com seriedade, ética e em prol de uma melhor qualidade de vida, que nos foi permitido ter o material para este estudo. Aos médicos e funcionários dos Hospitais da Santa Casa, João Paulo II, Santo Ivo, Odilon Behrens e do Centro de Saúde Jardim, Montanhês, muito obrigada Tércia, Lilian, Último e Érica. Agradeço a Alice, o Bruno e o Mauricio pela colaboração no recrutamento e coleta de amostras em São José do Rio Preto.

Ao professor Flávio da Fonseca, por nos orientar durante a padronização da titulação viral, bem como a Tânia e a Bárbara, que me ajudaram com as culturas de células, titulação e soroneutralização. E como a pesquisa nos reserva muitas emoções, principalmente nas sextas-feiras à tarde, agradeço aos professores que nos emprestaram por alguns períodos seus freezers -80°C. Aos colegas do curso de Bases, em especial a Suelen, ao Marcelo e a Rebeca, por tornarem mais fácil e agradável esta experiência intensa e exaustiva que é o curso de Bases. Ao Leo que nesta etapa final foi um grande amigo e confidente seguimos na luta contra as piores faces humanas. Obrigada Patiu pela escuta de outro dia!

Agradeço a Cecília minha psicóloga que está me ajudando e muito! E ao programa Alcance da Shelter.

Ao George meu professor de inglês que me ajudou a passar na prova de mestrado e me deu base para frequentar os congressos.

Agradeço pela oportunidade de apresentar trabalhos no SBI (2015, 2017, 2018), ENAPEBI 2018, no Simpósio Sul de Imunologia 2018, ao departamento pelos seminários e também durante a avaliação do departamento em 2017. E o SBV 2019 por me premiar como melhor pôster.

Agradeço aos professores Célio, Juarez, Marina e Mandala da FAE, pela oportunidade viver uma docência resgatando o que há de mais humano.

Aos professores Ana Caetano, Mauro, Andréa Teixeira, Marcelo Bozza, Vivian e Patiu por aceitarem participar desta banca.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia.

Ao CNpQ, Capes e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Agradeço a Leticia Belintani por eternizar em minha pele o que já sinto em minha alma, gratidão! Foi uma longa jornada até aqui, e estes sete anos somado aos anteriores precisavam ser expressos em mim.



## RESUMO

**Introdução:** A dengue é uma infecção viral e pode ser classificada em dengue leve, normalmente tratada domiciliarmente, e dengue com sinais de alarme (sa+) e dengue grave (sa+/grave), que requerem hospitalização. Manifestações graves da dengue são consideradas o resultado da ativação exacerbada da resposta imune. A importância dos mecanismos reguladores promovidos por moléculas e citocinas anti-inflamatórias das células T multifuncionais e T reguladoras (Tregs) no controle das respostas inflamatórias é evidente em muitas doenças infecciosas. Portanto, nosso objetivo foi investigar a presença destes mecanismos em diferentes formas clínicas da infecção por dengue. **Métodos e Resultados:** células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com dengue foram cultivadas na presença da biblioteca de peptídeos para as proteínas virais de envelope (ENV) ou NS3 de DENV1. Pacientes com dengue leve apresentaram níveis mais altos de IFN $\gamma$ , TNF e IL12p70 no plasma quando comparado com o grupo sa+/grave. As frequências de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> específicas para DENV simples ou duplo produtoras (TNF ou IL10 ou IFN $\gamma$ /TNF ou IFN $\gamma$ /IL10) foram maiores em dengue leve quando comparado com as formas clínicas sa+/grave. Além disso, pacientes com dengue leve apresentaram níveis mais altos de células T específicas para NS3 triplo produtoras de IFN $\gamma$ , TNF e IL10 que o grupo sa+/grave. Dentre as moléculas reguladoras avaliadas, verificamos que pacientes com dengue aumentam as frequências de células Teff GITR<sup>+</sup> ou LAP<sup>+</sup> ou PD1<sup>+</sup>, e células Tregs CD226<sup>+</sup> e CTLA4<sup>+</sup>. Por outro lado, pacientes com dengue leve apresentaram elevadas frequências de Tregs CD200<sup>+</sup> e de modo importante elevadas frequências de tTregs GITR<sup>+</sup> produtoras de IL10 específicas ao DENV, população pouco entrada em pacientes com dengue sa+/grave. Além disso, usando o mapeamento de epítipo da biblioteca de peptídeos do ENV de DENV1, conseguimos identificar peptídeos associados a produção de IL10 pelas Tregs. **Conclusão:** A evolução clínica da dengue parece relacionar-se com mecanismos reguladores da resposta imune. Tregs de indivíduos com dengue sa+/grave apresentaram deficiência importante em marcadores de ativação, sugerindo um fenótipo disfuncional e a produção de IL10 por células T multifuncionais e por células tTregs GITR<sup>+</sup> está associada à apresentação clínica de dengue leve, sugerindo que esses mecanismos reguladores são importantes para limitar a imunopatologia da dengue.

**Palavras-chave:** célula Treg, imurregulação e dengue

## ABSTRACT

**Introduction:** Dengue is a viral infection and can be classified into mild dengue, usually treated at home, and dengue with warning signs (sa+) and severe dengue (sa+/severe), which require hospitalization. Severe manifestations of dengue are considered to be the result of exacerbated activation of the immune response. The importance of regulatory mechanisms promoted by anti-inflammatory molecules and cytokines of multifunctional and regulatory T cells (Tregs) in controlling inflammatory responses is evident in many infectious diseases. Therefore, our objective was to investigate the presence of these mechanisms in different clinical forms of dengue infection.

**Methods and Results:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from dengue patients were cultured in the presence of the peptide library for the viral envelope proteins (ENV) or NS3 of DENV1. Patients with mild dengue had higher plasma levels of IFN $\gamma$ , TNF and IL12p70 when compared to the sa+/severe group. The frequencies of specific CD4+ or CD8+ T cells producing single or double DENV (TNF or IL10 or IFN $\gamma$ /TNF or IFN $\gamma$ /IL10) were higher in mild dengue when compared to sa+/severe clinical forms. Furthermore, patients with mild dengue had higher levels of triple NS3-specific T cells producing IFN $\gamma$ , TNF, and IL10 than the sa+/severe group. Among the regulatory molecules evaluated, we verified that patients with dengue increase the frequencies of Teff GITR+ or LAP+ or PD1+ cells, and Tregs CD226+ and CTLA4+ cells. On the other hand, patients with mild dengue showed high frequencies of CD200+ Tregs and, importantly, high frequencies of GITR+ tTregs that produce IL10 specific to DENV, a population that is rarely used in patients with sa+/severe dengue. Furthermore, using epitope mapping of the DENV1 ENV peptide library, we were able to identify peptides associated with IL10 production by Tregs.

**Conclusion:** The clinical evolution of dengue seems to be related to regulatory mechanisms of the immune response. Tregs from individuals with sa+/severe dengue showed an important deficiency in activation markers, suggesting a dysfunctional phenotype, and the production of IL10 by multifunctional T cells and by tTregs GITR+ cells is associated with the clinical presentation of mild dengue, suggesting that these regulatory mechanisms are important to limit dengue immunopathology.

**Keywords:** Treg cell, immunoregulation and dengue

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Mapa de distribuição da dengue no mundo. ....	<b>15</b>
<b>Figura 2</b> – Classificação Clínica da Dengue.....	<b>19</b>
<b>Figura 3</b> – Localização dos epítomos reconhecidos pelas células T.....	<b>20</b>
<b>Figura 4</b> – Geração de células Tregs FoxP3 <sup>+</sup> Tímicas e Periféricas. ....	<b>25</b>
<b>Figura 5</b> – Representação dos mecanismos de supressão utilizados por células Tregs. ....	<b>28</b>
<b>Figura 6</b> – Estratégia de <i>gate</i> do Painel de Citocinas.....	<b>43</b>
<b>Figura 7</b> – Estratégia de análise das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> .....	<b>44</b>
<b>Figura 8</b> – Estratégia de <i>gate</i> do Painel das células Tregs. ....	<b>45</b>
<b>Figura 9</b> – Níveis plasmáticos de IFN $\gamma$ , TNF e IL10.....	<b>49</b>
<b>Figura 10</b> – Frequência de células T CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup> simples produtoras de IFN $\gamma$ , TNF ou IL10. ....	<b>51</b>
<b>Figura 11</b> – Frequência de células T CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup> duplo produtoras de IFN $\gamma$ /TNF ou IFN $\gamma$ /IL10 ou TNF/IL10.....	<b>53</b>
<b>Figura 12</b> – Frequência de células T CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup> triplo produtoras de IFN $\gamma$ /TNF/IL10.....	<b>56</b>
<b>Figura 13</b> – MFI da produção de citocinas por células T CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup> simples, duplo ou triplo produtoras de IFN $\gamma$ , TNF e IL10 em pacientes com dengue leve durante a fase crítica. ....	<b>55</b>
<b>Figura 14</b> – Níveis plasmáticos de IL27 e IL12p70.....	<b>57</b>
<b>Figura 15</b> – Frequências das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup> .....	<b>58</b>
<b>Figura 16</b> – Expressão de CD127, CD200, GITR, LAP e PD1 por células Teff CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> .....	<b>59</b>
<b>Figura 17</b> – Frequência Total de Tregs e Razão entre a frequência de Tregs/Teff.....	<b>60</b>
<b>Figura 18</b> – Frequência de Tregs expressando GITR, CD200, LAP, PD1, CTLA4, LAG3 e CD226.....	<b>62</b>
<b>Figura 19</b> – MFI de GITR, CD200, LAP, PD1, CTLA4, LAG3 e CD226 expressas em células Tregs. ....	<b>64</b>
<b>Figura 20</b> – Frequência de células Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV1. ....	<b>65</b>
<b>Figura 21</b> – Correlação de Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV1 e Tregs GITR <sup>+</sup> ou CD200 <sup>+</sup> .....	<b>66</b>

<b>Figura 22</b> – Expressão de Helios, Tbet ou Ki67 pelas Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV1.....	<b>68</b>
<b>Figura 23</b> – Mapeamento de epitopo da proteína ENV de DENV1 utilizando Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV1. ....	<b>69</b>
<b>Figura 24</b> – Comparação da produção de IL10 pelas células Tregs e por células Tr1. ....	<b>70</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Casos prováveis de dengue por mês de início de sintomas, 2011 a 2020, MG..	<b>16</b>
<b>Tabela 2</b> – Oligo e sondas utilizadas .....	<b>33</b>
<b>Tabela 3</b> – Sequência de a.a. dos peptídeos das bibliotecas de Env e NS3 de DENV1 .....	<b>34</b>
<b>Tabela 4</b> – Painel de Subpopulações de células T.....	<b>39</b>
<b>Tabela 5</b> – Painel de Tregs I .....	<b>39</b>
<b>Tabela 6</b> – Painel de Células T multifuncionais. ....	<b>41</b>
<b>Tabela 7</b> – Painel de Tregs II.....	<b>41</b>
<b>Tabela 8</b> – Painel de Tregs III.....	<b>42</b>
<b>Tabela 9</b> – Características gerais da coorte.....	<b>48</b>
<b>Tabela 10</b> – Correlação entre os níveis plaquetários e a frequência de células T produtoras de citocinas específicas ao DENV. ....	<b>56</b>
<b>Tabela 11</b> – Correlação entre as células Tregs GITR <sup>+</sup> e as Tregs expressando CD200, LAP, PD1, CD226, CTLA4 ou LAG3. ....	<b>67</b>

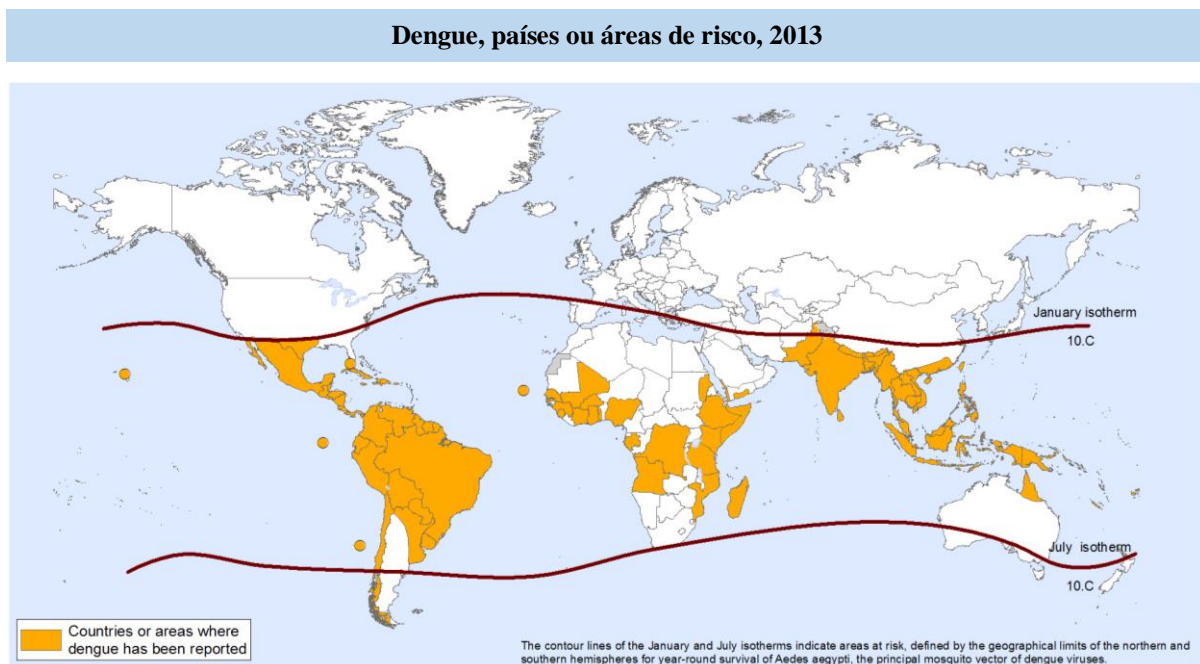
## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos .....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 Recrutamento de Voluntários, informações clínicas .....	31
3.2 Coleta e processamento de Amostras .....	31
3.3 Cultura de Células e Vírus .....	32
3.4 Diagnóstico Molecular .....	32
3.5 Diagnóstico sorológico, infecção secundária e critérios de inclusão .....	33
3.6 Dosagem de citocinas plasmáticas .....	34
3.7 Biblioteca de Peptídeos e Pools para Mapeamento de Epitopo .....	34
3.8 Avaliação de citocinas intracelulares e Imunofenotipagem .....	38
3.8.1 Cultura de Células .....	38
3.8.2 Painel T de memória e Painel de Tregs I.....	38
3.8.3 Painel de Células T multifuncionais, Painel de Tregs II e Painel de Tregs III .....	40
3.8.4 Análises das citometrias de fluxo.....	42
3.9 Análises Estatística.....	46
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
4.1 Dados da coorte.....	47
4.2 Indivíduos com sa+/grave dengue desenvolveram uma resposta inflamatória sistêmica escassa associada a altos níveis plasmáticos de IL10 .....	48
4.3 Pacientes com dengue leve apresentaram frequências mais altas de células T produtoras de TNF e IL10, mas não de IFN $\gamma$ , específicas ao DENV quando comparadas a pacientes sa+/grave.....	50
4.4 Indivíduos com dengue leve apresentaram altas frequências de células T multifuncionais .....	52
4.5 O aumento na frequência de células T duplo ou triplo produtoras está positivamente relacionado com maiores níveis sanguíneos de plaquetas.....	58

4.6 A diferença na IL12, mas não na IL27, está associada à presença de células T multifuncionais produtoras de IL10 em dengue leve .....	56
4.7 Subpopulações das células T e expressão de moléculas reguladoras nas células Teff ...	57
4.8 A frequência de células Tregs é similar entre as diferentes classificações da dengue ....	59
4.9 De um modo geral as células Tregs GITR <sup>+</sup> ou CD200 <sup>+</sup> ou LAG3 <sup>+</sup> parecem ser importantes para determinar a evolução clínica da doença em pacientes com dengue .....	61
4.10 Paciente com dengue leve possuem população de Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV1.....	65
4.11 As células Tregs produtoras de IL10 específica ao DENV expressam GITR, mas não CD200 .....	66
4.12 As células Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV expressam marcador Helios, marcador de tTregs.....	67
4.13 Mapeamento de epitopo das Tregs produtoras de IL10 específicas ao ENV de DENV1 .....	68
4.14 Células Tregs são maiores produtoras de IL10 que as células Tr1 .....	70
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma infecção viral transmitida por mosquito que é principalmente caracterizada por uma febre aguda autolimitada, que se resolve espontaneamente na maioria dos casos (WHO, 2009). Nos últimos 50 anos, houve um aumento de 30 vezes na incidência da infecção pelo vírus da dengue, que atualmente está amplamente distribuída nos países tropicais e subtropicais (Fig. 1). Cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem nessas áreas endêmicas, e estimativas conservadoras calculam que cerca de 50 milhões de pessoas por ano sejam acometidas por esta doença no mundo (GUZMAN, *et al.*, 2016). Minas Gerais, que possui uma população de aproximadamente 21 milhões de habitantes, apresentou 4 grandes epidemias de dengue na última década, nos anos de 2013, 2015, 2016 e 2019 (Tabela 1) (SES-MG, 21/01/2020).



**Figura 1 – Mapa de distribuição da dengue no mundo.** As áreas preenchidas em amarelo representam regiões onde a dengue tem sido reportada. Fonte: WHO 2014 disponível em: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_DengueTransmission\\_ITHRiskMap.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png).



Mês	Ano de início dos sintomas									
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Jan	3.800	2.342	35.524	5.004	7.057	57.518	4.685	2.113	16179	2246
Fev	5.626	2.600	62.561	8.579	9.322	137.121	4.303	2.322	33006	
Mar	7.351	3.891	146.926	11.300	27.814	156.363	5.212	4.652	81026	
Abr	8.665	4.756	123.960	15.370	59.885	120.408	3.694	7.373	145992	
Mai	6.918	3.848	31.313	9.811	51.089	35.974	2.860	4.268	151184	
Jun	1.690	2.526	7.231	3.495	14.083	4.691	1.444	1.571	40755	
Jul	657	1.223	1.655	1.115	3.281	988	585	784	6377	
Ago	419	650	673	547	1.214	597	486	499	1589	
Set	399	535	578	652	956	617	520	535	1275	
Out	504	659	746	641	1.287	725	640	798	1153	
Nov	880	1.162	1.057	874	3.790	1.158	671	1.459	1765	
Dez	1.364	6.356	2.524	1.101	14.334	1.667	1.000	3.613	2783	
<b>Total</b>	<b>38.273</b>	<b>30.548</b>	<b>414.748</b>	<b>58.489</b>	<b>194.112</b>	<b>517.830</b>	<b>26.100</b>	<b>29.987</b>	<b>483.081</b>	<b>2246</b>

**Tabela 1 – Casos prováveis de dengue por mês de início de sintomas, 2011 a 2020, MG.** Fonte: Boletim epidemiológico das doenças transmitidas pelo *Aedes*: dengue, chikungunya e zika, nº 162, semana epidemiologia 03, data de atualização 21/01/2020 da Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais. Disponível em [https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias\\_e\\_eventos/000\\_2020/Boletins\\_Aedes/Boletim%2021-01-2020.pdf](https://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2020/Boletins_Aedes/Boletim%2021-01-2020.pdf)

A dengue causa impactos econômicos muito importantes nas regiões acometidas devido ao grande número de casos, aos custos alocados para saúde, como manejo clínico adequado, hospitalizações, além das perdas causada pelas faltas ao trabalho. Em um estudo realizado durante os anos de 2005 e 2006 que avaliou 1695 pacientes de 8 países, 5 localizados nas Américas (incluindo o Brasil) e 3 na Ásia, foi demonstrado que pacientes com dengue leve os ambulatoriais tiveram uma perda média de dias de estudo ou de trabalho de 14,8 dias, enquanto que os pacientes hospitalizados perdem em média 18,9 dias. Os custos para os casos ambulatoriais e hospitalizados não fatais foram de US \$514 e US \$1394, respectivamente, e, quando há risco de morte, é somado um custo de US \$828. O Brasil foi responsável por 94% destes custos da dengue nas Américas (SUAYA, *et al.*, 2009).

Outro trabalho acerca dos custos financeiros causado pela dengue estudou 8.226 casos suspeitos de dengue durante o ano de 2010 em Dourados, no estado de Mato Grosso do Sul no Brasil. Foi demonstrado que o gasto global com hospitalizações chegou à US \$210.084,30, que correspondeu a 2,5% do PIB municipal daquele ano, além disso, quando foi necessário algum tipo de produto derivado do sangue, como transfusão de plaquetas, houve um custo quase 3 vezes maior que os casos que não precisaram (VIEIRA MACHADO, *et al.*, 2014).

Os trabalhos mostram que os casos de dengue tratados implicam em custos na área da saúde e na economia global. Porém, estes cálculos são muito conservadores segundo a WHO, pois

ignoram os gastos financeiros com casos subnotificados e de programas de controle e vigilância vetorial (WHO, 2009). Os dados disponíveis de notificações não acompanham a realidade do dramático aumento da incidência de dengue em todo o mundo devido a subnotificações e classificações errôneas dos casos de dengue. Por isso, o que se tem é uma estimativa de que ocorram 390 milhões (IC 95%, 284-528 milhões) de infecções causadas pela dengue por ano e destas cerca de 96 milhões (67-136 milhões) procuram os serviços de saúde (BHATT, *et al.*, 2013). Outro trabalho calculou que cerca de 3,9 bilhões de pessoas de 128 países vivem em área de risco para infecção pelo vírus dengue (BRADY, *et al.*, 2012). Tais dados denotam a relevância desse problema de saúde pública.

Os vírus da dengue são constituídos de uma fita simples de RNA positivo, membros da família *Flaviviridae*, denominados de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, todos circulantes no Brasil. A identidade gênica da sequência primária dos quatro sorotipos é de 65-70% (GUZMAN, *et al.*, 2010). Não está claro o tropismo dos vírus em hospedeiros humanos, mas existem evidências de que as infecções acometem principalmente células mononucleares fagocitárias como macrófagos, monócitos e células dendríticas (MATHEW; TOWNSLEY; ENNIS, 2014), embora outras células imunológicas possam ser infectadas (SILVEIRA, *et al.*, 2018). A infecção pelo vírus levará a liberação do material genético no citoplasma, que será traduzido em uma única poliproteína (Fig. 3) constituída de três proteínas estruturais: ENV (envelope), C (capsídeos) e pré-Membrana (pM), e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008; FISCHL; BARTENSCHLAGER, 2011). Os vírus imaturos contendo a pM e ENV, tornam-se infecciosos e maduros no Complexo de Golgi, onde a pM é clivada (JAIN; CHATURVEDI; JAIN, 2014; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

A dengue é principalmente transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti* fêmea, presente preferencialmente nas áreas urbanas, mas também pode ser transmitida pelo *Aedes albopictus* presente em países de clima temperado. Estes vetores podem introduzir qualquer um dos quatro sorotipos virais no hospedeiro (WEISKOPF; SETTE, 2014). Acredita-se que um controle efetivo dos mosquitos auxiliaria significativamente no combate à dengue. Segundo a WHO, o mosquito *Aedes aegypti* foi erradicado do Brasil em 1958, em decorrência de um programa contra a febre amarela da Organização Pan Americana de Saúde (OPAS). Porém, após a

descontinuidade do programa, houve a reintrodução do *Aedes aegypti* na América do Sul, juntamente com a cocirculação de múltiplos sorotipos do DENV (TEIXEIRA, *et al.*, 2013).

Atualmente existem várias formas comprovadamente eficazes de se combater o mosquito, sendo a mais simples delas a eliminação dos criadouros (WHO, 2009). Outras alternativas são a modificação genética ou introdução da bactéria *Wolbachia* nos mosquitos, que induzem respectivamente a eliminação do vetor da dengue (WISE DE VALDEZ, *et al.*, 2011) e a resistência à infecção pelo vírus dengue (MOREIRA, *et al.*, 2009; WALKER, *et al.*, 2011).

Além disso, o desenvolvimento de uma vacina eficaz seria ideal para o controle epidemiológico da dengue. A vacina desenvolvida pela SANOFI-PASTEUR apresentou uma proteção estimada de 60,8% aos quatro sorotipos virais, mas o nível de proteção variou entre os sorotipos (DENV1 - 50,3%, DENV2 - 42,3%, DENV3 - 74,0% e DENV4 - 77,7%). Nota-se que a eficácia é alta para DENV3 e DENV4 e fraca para DENV2. Mas a vacina contribuiu para uma redução na sintomatologia da dengue e apresentou eficácia elevada contra dengue grave e hospitalizações. Outros dados interessantes são que a idade e o contato prévio com vírus da dengue estariam contribuindo para o desempenho da vacina. Assim, para indivíduos soronegativos a eficácia geral da vacina foi de apenas 52,5%, já a proteção em indivíduos soropositivos foi de 81,9% (GUY, *et al.*, 2015). Infelizmente, dados recentes demonstraram que essa vacina foi responsável por causar um aumento de casos graves de dengue em indivíduos soronegativos sendo, dessa forma, seu uso não recomendado para essa população (SRIDHAR, *et al.*, 2018).

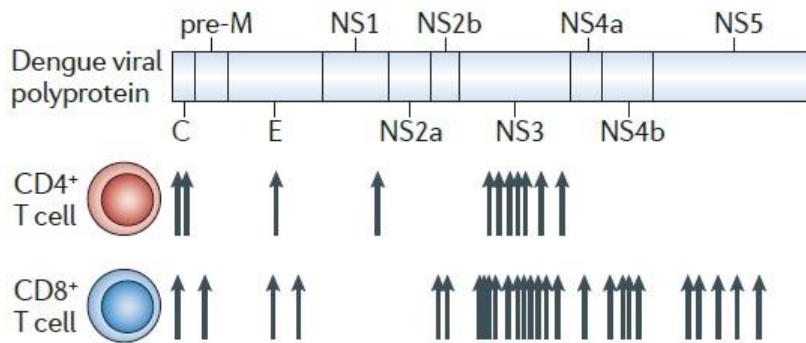
A grande maioria dos casos de dengue são assintomáticos ou subclínicos, ou seja, os indivíduos infectados não apresentam sintomas aparentes, mas a manifestação clínica pode variar de sintomas febris leves a casos de grave de febre hemorrágica. Segundo a WHO 2009 a dengue pode ser classificada em três categorias distintas, dependendo das manifestações clínicas e parâmetros laboratoriais que os pacientes apresentam. A maioria dos indivíduos infectados por dengue tem uma doença autolimitada denominada de dengue sem sinais de alarme (sa-), e apresentam febre, mialgia, cefaleia, entre outros sintomas que podem ser tratados em casa. Os pacientes com dengue com sinais de alarme (sa+) demandam maior atenção clínica, justamente por conta de sinais de alarme como vômitos persistentes, sangramentos, queda abrupta de plaquetas e outros. E os casos graves de dengue, podem apresentar acometimento grave de órgãos, perda intensa de fluidos, hemorragia grave, e outros, portanto necessitam de acompanhamento clínico rigoroso (Fig. 2).



**Figura 2 – Classificação Clínica da Dengue.** Desenho esquemático com os principais sinais e sintomas encontrados em indivíduos acometidos por dengue e suas correspondentes classificações segundo os critérios da (WHO, 2009).

A fisiopatogênese da dengue com sinais de alarme e dengue grave pode estar associada a fatores do próprio vírus como virulência da cepa (HALSTEAD; COHEN, 2015) e/ou a fatores intrínsecos do hospedeiro, como a idade, o grupo sanguíneo (COFFEY *et al.*, 2009), a reinfecção por sorotipo diferente, a existência de comorbidades como doenças crônicas, diabetes e asma (WHO, 2009) ou devido à resposta imune desregulada (MATHEW; ROTHMAN, 2008; ROTHMAN, 2011; ROUSE; SEHRAWAT, 2010).

De modo sucinto, a resposta imune ao vírus da dengue se inicia quando o vírus infecta as células apresentadoras de antígeno profissionais, como as dendríticas, que promovem a ativação das células T que passam a produzir e liberar citocinas. Dentre os epítomos reconhecidos pelas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, os mais imunogênicos estão nas proteínas virais C, ENV (E), NS3 e NS5 (Fig. 3), sendo que a NS3 é uma das proteínas mais conservadas entre os flavivírus e apresenta um alto nível de conservação de aminoácidos (a.a.) entre os sorotipos de dengue (DUANGCHINDA *et al.*, 2010; MATHEW; TOWNSLEY; ENNIS, 2014).



**Figura 3 – Localização dos epítomos reconhecidos pelas células T.** Desenho esquemático da poliproteína do vírus da dengue. As setas demonstram os locais de epítomos bem definidos que são reconhecidos pelas células T humanas. Fonte: (Rothman, 2011).

As células T desempenham funções relevantes que contribuem para a eliminação da infecção da dengue. Por exemplo, em uma infecção primária o que normalmente ocorre é a ativação das células T levando à expansão clonal destas e eliminação da infecção. As células T CD8<sup>+</sup> reconhecem as células infectadas e podem eliminá-las (ROTHMAN, 2011), e também produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias como IFN $\gamma$  e TNF (HATCH *et al.*, 2011). As células T CD4<sup>+</sup> auxiliam e aumentam a resposta das células T CD8<sup>+</sup>, promovem a ativação plena das células B, regulam a resposta imune através da liberação de mediadores anti-inflamatórios, como IL10, elevam o nível de ativação e a capacidade citotóxica de células infectadas, e promovem o desenvolvimento da memória celular (DUANGCHINDA *et al.*, 2010; LUHN *et al.*, 2007).

Um indivíduo infectado pela primeira vez com o vírus da dengue estará protegido por um longo período à reinfecção pelo mesmo sorotipo, proteção essa conhecida como homotípica (MATHEW; ROTHMAN, 2008). Além disso, estará também protegido contra a infecção a qualquer um dos demais sorotipos por um tempo curto, conhecida como proteção heterotípica (ROTHMAN, 2011). Acredita-se que essa proteção heterotípica deva-se a altos títulos de anticorpos neutralizantes com reatividade cruzada. Estes anticorpos neutralizantes opsonizam os vírus e impedem a infecção de novas células, conferindo resistência ao vírus (AUSTIN *et al.*, 2012;

UBOL *et al.*, 2010). Porém, estes anticorpos neutralizantes de reatividade cruzada perdem rapidamente seus títulos em cerca de três meses, e os indivíduos estarão tão ou mais suscetíveis aos outros sorotipos do vírus (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2010).

A fim de elucidar os mecanismos pelos quais a resposta imune pode estar contribuindo para evolução da fisiopatogenese encontrada na dengue foram elaboradas algumas teorias, sendo as principais a hipótese do Aumento Dependente de Anticorpos (“Antibody-Dependent Enhancement” ou ADE) e a do Pecado Antigênico Original. Ambas convergem em uma Tempestade de Citocinas que leva a um quadro de inflamação sistêmica culminando em um extravasamento plasmático. Em uma infecção secundária heterotípica, pode ocorrer o fenômeno conhecido como ADE, que é caracterizado pelo aumento da infecção capacidade de infecção viral mediado pela presença de anticorpos específicos ao sorotipo da infecção primária, mas com reatividade cruzada ao novo sorotipo e incapazes de neutralizá-lo (ROTHMAN, 2011). A opsonização do vírus durante uma infecção heterotípica sem promover neutralização pode facilitar a entrada dos vírus nas células via Receptores Fc $\gamma$  I e II, inclusive de vírus imaturos que são incapazes de infectar uma célula ativamente (BELTRAMELLO *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2014). Esse fenômeno aumenta a replicação viral durante uma infecção secundária heterotípica, elevando a viremia e induzindo as células do sistema imune inato e adaptativo a produzirem grandes quantidades de citocinas, conhecido como a Tempestade de Citocinas (FERRARA, 1993), que por sua vez acabam desencadeando todo o processo patológico da dengue (DUANGCHINDA *et al.*, 2010; ROTHMAN, 2011). De fato, alguns trabalhos demonstram que os níveis de citocinas como TNF, IFN $\gamma$  e IL2 estão muito aumentados em indivíduos com dengue grave (ROTHMAN, 2011; ZELLWEGER; PRESTWOOD; SHRESTA, 2010). Entretanto, outros trabalhos demonstram que a presença de altos níveis de IFN $\gamma$ , TNF e IL2 podem também estar associados ao controle da infecção (HATCH *et al.*, 2011; MANGADA, MARLOU M *et al.*, 2002).

Além do ADE, o Pecado Antigênico Original (FRANCIS, 1960) é outra hipótese que tenta explicar o aumento de casos graves observados em uma infecção secundária heterotípica por dengue. Tal como os linfócitos B, os linfócitos T também podem apresentar reatividade cruzada. Assim, em infecções secundárias, pode ocorrer uma expansão seletiva de clones de linfócitos T específicos ao vírus da primeira infecção com reatividade cruzada. Como há uma expansão privilegiada de células de memória com reatividade cruzada, alguns autores acreditam que eventualmente parte destas células não são adequadas para combater especificamente o novo vírus,

ocorrendo então a ativação de um grande número de células de memória que são, de certa forma, ineficientes para combater o segundo vírus (ROTHMAN, 2011). Então, estas células produziram grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias como  $IFN\gamma$ , TNF e IL6, justamente durante o período de febre, o que leva à hiperativação do endotélio, podendo desencadear os sintomas relacionados ao aumento da permeabilidade vascular, hemorragias e choques (Duangchinda *et al.*, 2010; Rothman, 2011).

No entanto, Guzman *et al.* (2013) demonstraram que há também um aumento da quantidade de casos assintomáticos de dengue em infecções secundárias, mesmo com a presença de anticorpos não neutralizantes, possivelmente associado à presença de uma resposta eficiente de linfócitos T citotóxicos produtores de  $IFN\gamma$  (GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013). Esses dados foram também comprovados experimentalmente em um estudo com camundongos que desenvolviam dengue grave mediada pela presença de anticorpos não neutralizantes, mas a transferência de células T  $CD8^+$  homotípicas ativas contra DENV preveniu o ADE nestes camundongos e ainda reduziu a carga viral (ZELLWEGER *et al.*, 2014). E alguns trabalhos relataram a presença de altos níveis de células T  $CD4^+$  produtoras das citocinas  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  e IL2 em pacientes assintomáticos (HATCH *et al.*, 2011; MATHEW; TOWNSLEY; ENNIS, 2014). Tais dados, embora comprovem a ocorrência do fenômeno do Pecado Antigênico Original, colocam em dúvida sua contribuição como fator deletério na infecção por dengue.

Portanto, de acordo com essas hipóteses, o aumento da carga viral na infecção secundária desencadeado pelo ADE induz as células a produzirem grandes quantidades de citocinas inflamatórias, como IFNs do tipo I e II, e citocinas vasoativas, como TNF. Do mesmo modo, os clones inespecíficos, exemplificados pelo fenômeno do Pecado Antigênico Original, estão relacionados a uma infecção secundária heterotípica e poderiam também contribuir para patologia da dengue aumentando o processo inflamatório. É importante ressaltar que as complicações encontradas na dengue com sinais de alarme e dengue grave, como extravasamento plasmático grave, se iniciam durante a defervescência, quando a viremia está em resolução, que é simultaneamente quando há uma forte resposta dos linfócitos T, implicando na produção de elevados níveis de citocinas inflamatórias (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2008). Estas observações sugerem que o DENV não é o único e nem o grande responsável pela patologia encontrada na dengue.

Dessa forma, a indução da resposta imune ótima ou subótima depende de todo o contexto em que o indivíduo infectado enfrenta – como a cepa do vírus, a carga viral, se é uma infecção secundária que pode facilitar fenômenos como o ADE, e conseqüentemente a Tempestade de Citocinas. Embora os modelos que expliquem a evolução da dengue grave convirjam em um mecanismo pró-inflamatório exacerbado, pouco se conhece sobre os mecanismos de regulação da resposta inflamatória à dengue.

As respostas inflamatórias podem ser controladas por mecanismos reguladores mediados por populações celulares que suprimem estas atividades efetoras. Este controle das respostas pró-inflamatórias pode ocorrer por meio da indução de moléculas reguladoras, como PD1 e CTLA4, expressas pelas células T efetoras, ou pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL10 e TGF $\beta$  (ROUSE; SEHRAWAT, 2010). Neste trabalho abordamos o perfil regulador das células T multifuncionais produtoras de IL10 e células T reguladoras.

Há pouca informação sobre células T multifuncionais na infecção por dengue, principalmente no que diz respeito às células Th1 IL10<sup>+</sup> e Tc1 IL10<sup>+</sup>. Mas em outras doenças como malária (FREITAS DO ROSARIO *et al.*, 2012; JAGANNATHAN *et al.*, 2014), toxoplasmose (JANKOVIC *et al.*, 2007), doença de Chagas (FLORES-GARCÍA *et al.*, 2011; ROFFE *et al.*, 2012) e influenza (SUN *et al.*, 2009) as células T IL10<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> específicas do patógeno estão associadas a evolução favorável destas doenças. Por outro lado, essas células T multifuncionais estão associadas a respostas efetoras prejudicadas à leishmaniose (ANDERSON *et al.*, 2007) e tuberculose (MOREIRA-TEIXEIRA *et al.*, 2017), mas ainda são consideradas um importante mecanismo para limitar a patologia a essas mesmas doenças. A Th1 IL10<sup>+</sup> também pode expressar outras citocinas além da IL10 e IFN $\gamma$ , como a produção de TNF, uma citocina que possui propriedades antivirais (ALEJO *et al.*, 2018).

Além disso, as células T CD4<sup>+</sup> reguladoras (Tregs) medeiam uma resposta anti-inflamatória efetiva em diversas doenças e desempenham um papel importante na tolerância periférica que permite regular a ativação de células T efetoras e da resposta imune inata, permitindo minimizar os danos colaterais nos tecidos. Além disso, as Tregs previnem respostas exacerbadas em infecções agudas ou crônicas. Portanto, as Tregs são constantemente requisitadas pelo hospedeiro para monitorar a resposta imune a fim de prevenir prejuízo aos tecidos devido à inflamação (BELKAID; V. TARBELL, 2009; JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012).

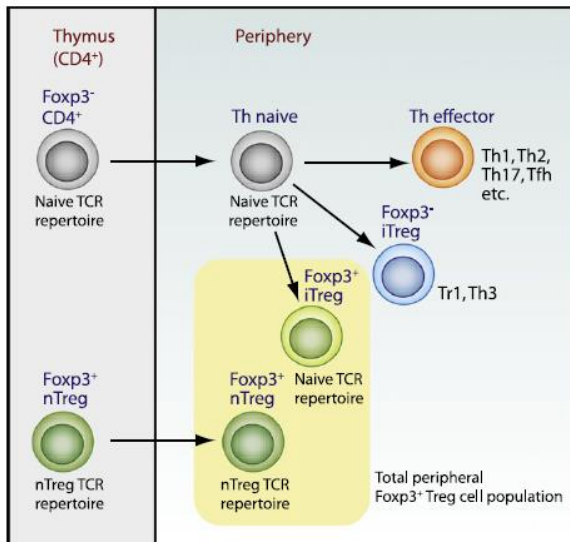


A expressão do fator de transcrição FoxP3 por células Tregs é a assinatura mais usada para caracterizar uma célula Treg, tendo em vista que a expressão deste gene é um regulador crítico para desenvolvimento e função das Tregs (FONTENOT, J.; GAVIN; RUDENSKY, 2003; HORI ET AL., 2003; KHATTRI *et al.*, 2003; SAKAGUCHI *et al.*, 2008; ZHENG; RUDENSKY, 2007). No entanto, para melhor definir uma célula Treg humana é necessário o uso de outros marcadores, como por exemplo, as moléculas de superfície CD25 e CD127. A molécula CD25 é a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL2, uma importante citocina para a ativação e sobrevivência de células T, e é constitutivamente expressa pelas Tregs (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012). Outra molécula de superfície que pode ser usada é a CD127, que é a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL7. Esta molécula é pouco expressa após a ativação das células T, mas são novamente expressas na maioria das células T de memória. Portanto o uso de CD127 como marcador de superfície auxilia na seleção de uma população de Tregs mais puras provenientes do sangue periférico (LIU *et al.*, 2006) e contribui na distinção entre uma célula T convencional virgem ou de memória (CD127<sup>hi</sup>) e uma Treg (CD127<sup>low</sup>) (SEDDIKI *et al.*, 2006). Dessa forma, neste trabalho caracterizamos as Tregs pela expressão de CD25<sup>hi</sup>, CD127<sup>low</sup> e FoxP3<sup>+</sup>.

As células Tregs podem ser classificadas entre tímicas (tTregs) e induzidas (iTregs). As tTregs são geradas e amadurecem no timo por interações de alta afinidade com o complexo peptídeo próprio-MHC (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012). Entretanto, existem alguns trabalhos que demonstram a existência de células tTregs específicas a antígenos microbianos. Por exemplo, um estudo realizado com camundongos infectados com o vírus influenza demonstrou a proliferação de tTregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) em resposta ao antígeno do vírus influenza no pulmão e em menor proporção nos linfonodos mediastinais. (BEDOYA *et al.*, 2013). Sob certas condições também podem se desenvolver extra-timicamente, sendo conhecidas como Tregs periféricas ou induzidas (iTregs) (Fig.4) (BILATE; LAFAILLE, 2010; CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009).

Para se estudar o papel das tTregs durante o curso de uma infecção se faz necessária uma melhor definição do fenótipo ontológico destas células. Foi demonstrado que há um aumento na expressão do fator de transcrição Helios em Tregs (FONTENOT, J. D. *et al.*, 2005; GETNET *et al.*, 2010; SUGIMOTO *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que a presença de Helios, que interage com promotor de FoxP3, contribui para a capacidade supressiva das Tregs e que a manutenção da expressão de Helios ocorre apenas em tTregs, mas não em iTregs proveniente de

células T  $CD4^+CD25^-$  condicionadas a expressar FoxP3. Portanto Helios pode ser um marcador para distinguir tTregs e iTregs (GETNET *et al.*, 2010).



**Figura 4 – Geração de células Tregs FoxP3<sup>+</sup> Tímicas e Periféricas.** As células tTregs (denominadas de nTregs na figura), diferenciam-se no Timo e migram para os tecidos periféricos. As células Tregs FoxP3<sup>+</sup> induzidas (iTregs) diferenciam-se em órgãos linfóides secundários e tecidos. A população periférica de células Tregs FoxP3<sup>+</sup> compreende tanto as tTregs e iTregs. É muito provável que as células FoxP3<sup>+</sup> tTreg e iTreg diferem em seu repertório de TCR, pois as células iTreg são derivadas de células CD4<sup>+</sup> naíve periféricas maduras (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009).

As células Treg suprimem a proliferação de células T e a produção de citocinas inflamatórias como  $IFN\gamma$ , TNF e IL6 (LUHN *et al.*, 2007). Esta supressão ocorre através de vários mecanismos (Fig. 5), entre eles a produção de citocinas reguladoras como IL10 e  $TGF\beta$ , e a interação célula-célula que se utiliza de moléculas imunorreguladoras tais como CD200, GITR, LAP, PD1, LAG3, CTLA4 e CD226, dentre outras, com as moléculas expressas em células ativadas (MATHEW; TOWNSLEY; ENNIS, 2014). Porém nenhuma dessas são consideradas marcadores específicos para a população de Tregs (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012), mas o uso destas moléculas como marcadores em Tregs contribui para a melhor caracterização e fenotipagem destas células.

A glicoproteína transmembrana CD200 que é encontrada na superfície celular de alguns tecidos, como entotélio, rins, placenta e sistema nervoso central, é também expressa por linfócitos T ativados e células B (BARCLAY; CLARK; MCCAUGHAN, 1986; WRIGHT *et al.*, 2001), mas a expressão de seu ligante CD200R é restrita a células de linhagem mielóide como macrófagos, mastócitos e células dendríticas (PRESTON *et al.*, 1997; WRIGHT *et al.*, 2001). Alguns trabalhos demonstraram que a interação de CD200 com CD200R em macrófagos está relacionada com a supressão de suas atividades (BARCLAY *et al.*, 2002; GAISER *et al.*, 2018; HOEK *et al.*, 2000; JENMALM *et al.*, 2006), e outros indicam que o aumento da expressão de CD200 está envolvido

no aumento da frequência de Tregs (COLES *et al.*, 2012; GORCZYNSKI; LEE; BOUDAKOV, 2005).

GITR é uma molécula da superfamília de receptores de TNF, cuja a expressão é aumentada nos linfócitos T ativados e parece exercer um papel co-estimulador em células T efetoras (GURNEY *et al.*, 1999; NOCENTINI *et al.*, 1997). Além disso, GITR está envolvido no desenvolvimento de células Tregs e parece ser essencial para a supressão de linfócitos T mediada por CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (SHIMIZU *et al.*, 2002), bem como também foi relatado que a atividade supressiva de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> é regulada por GITR (BIANCHINI *et al.*, 2011).

A molécula LAP mantém o TGFβ em seu estado latente por dificultar sua interação com seus receptores, prevenindo então a ativação precoce desta citocina que está envolvida no processo de regulação de função e proliferação das células T (ALI *et al.*, 2008; ANNES, 2003; GANDHI; ANDERSON; WEINER, 2007). Foi relatado que LAP está relacionado com a função e a diferenciação de Tregs e que pode ser usado como um marcador de células Treg ativadas (CHEN *et al.*, 2008; DUAN *et al.*, 2011; GANDHI *et al.*, 2010; TRAN *et al.*, 2009).

PD1 possui uma função relacionada com a tolerância periférica (BELKAID; TARBELL, 2009) e é expressa em células T ativadas. A ativação de PD1 resulta na inibição da proliferação de células T e da secreção de citocinas (FRANCISCO; SAGE; SHARPE, 2010).

CTLA4 atua interagindo com as moléculas CD80/CD86 presente em células apresentadoras de antígenos, impedindo a ligação destas com o CD28, ou seja, impedindo a coestimulação necessária para ativação das células T. Está presente em linfócitos T convencionais apenas quando ativados, porém é constitutivamente expresso em altos níveis em Tregs (READ; MALMSTRÖM; POWRIE, 2000).

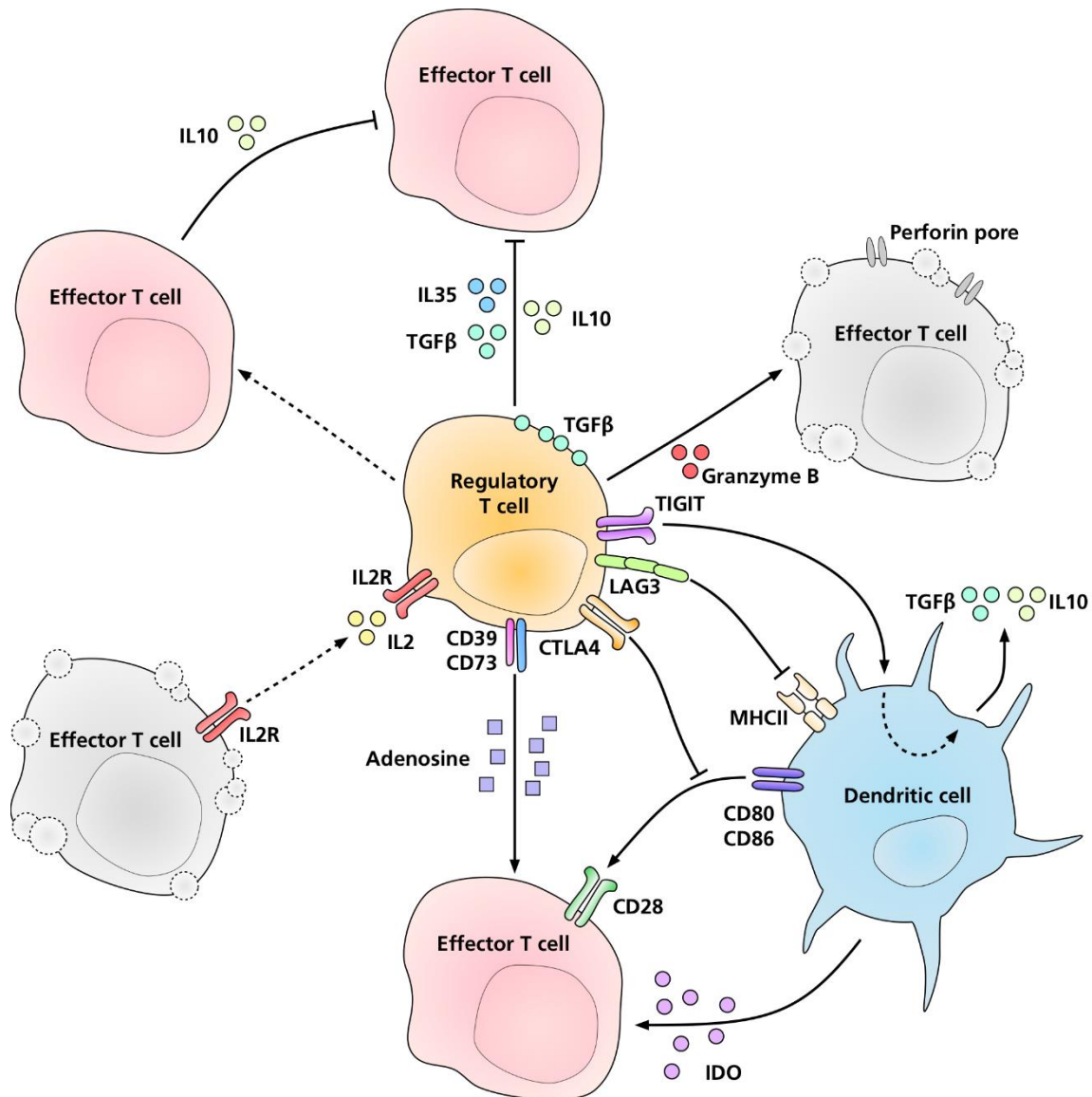
LAG3 é uma molécula homóloga ao CD4 e interage com moléculas MHC de classe II. Vários trabalhos indicam que está envolvida na regulação da ativação e na expansão de células T ativadas (HUARD *et al.*, 1995; WORKMAN *et al.*, 2004; WORKMAN; VIGNALI, 2003) e sua presença em Tregs pode indicar o estado ativado destas células, já que foi relatado que a presença de LAG3 em Tregs contribuiu significativamente para sua capacidade supressiva (HUANG *et al.*, 2004).

CD226 medeia adesão celular a outras células através de seus ligantes CD155 e CD112 (XU; JIN, 2010), por exemplo expressos em dendríticas, endoteliais, fibroblastos (FUCHS; COLONNA, 2006; SAKISAKA; TAKAI, 2004). CD226 está envolvido na diferenciação e

proliferação de células T naive (SHIBUYA *et al.*, 2003). Por outro lado, TIGIT, antagonista de CD226, pois também se liga aos CD155 e CD112, está relacionado com a supressão da atividade de células T, redução dos níveis de IL12p40 e aumento IL10 pelas dendríticas maduras imunoreguladoras (YU *et al.*, 2009). Foi relatado que TIGIT foi altamente expresso em tTregs e está associado a capacidade supressiva exercida pelas tTregs, enquanto que tTregs CD226<sup>+</sup> tinham uma função supressora reduzida, juntamente com aumento na produção de IL10 e IFN $\gamma$  pelas tTregs CD226<sup>+</sup> (FUHRMAN *et al.*, 2015). Em modelo de encefalomielite autoimune experimental, foi demonstrado que CD226 também atenuou a função reguladora das células Tregs e diminuiu os níveis de expressão de TIGIT e CTLA4 (WANG *et al.*, 2019). À luz desses dados, CD226 parece ser um marcador de Tregs disfuncionais.

A atividade das Tregs parece apresentar um papel duplo durante o curso de algumas infecções. Por um lado, desempenham adequadamente as atividades de controle da resposta inflamatória. Por outro, a atividade das Tregs pode levar a um controle exacerbado da resposta imune, inclusive aumentando a sobrevivência do patógeno e em alguns casos levando à persistência do mesmo por um longo período. Por exemplo, as Tregs impedem a eliminação do parasito *Leishmania major* em infecção crônica (BELKAID *et al.*, 2002). Outros demonstraram que as respostas mediadas pelas Tregs podem influenciar na amplitude da resposta e na subsequente patologia da doença (BELKAID; V. TARBELL, 2009) em infecções crônicas como Friend vírus (DITTMER *et al.*, 2004), HIV (KINTER *et al.*, 2004) e HCV (BELKAID; ROUSE, 2005). Tais estudos demonstraram que o aumento no número das Tregs pode comprometer a eficácia da resposta de T CD8<sup>+</sup> prejudicando o controle adequado dessas infecções.

O ambiente no qual as células Tregs irão atuar requer elementos reguladores específicos para manter ou restabelecer a homeostase local. Assim, alguns trabalhos demonstram que as Tregs também expressam fatores de transcrição relacionados com o tipo de resposta que elas modulam. Por exemplo, (SHAFIANI *et al.*, 2013) demonstraram que o *Mycobacterium tuberculosis* induz a proliferação de Tregs durante o início da infecção e a expressão de Tbet pelas Tregs foi importante para sua especialização funcional (SHAFIANI *et al.*, 2013). Da mesma forma, Chaudhry, *et al.* (2009) mostraram que as células Tregs expressando Stat3 controlaram respostas patogênicas de perfil Th17. Porém quando as Tregs deixam de expressar este fator de transcrição crítico para resposta Th17, os camundongos desenvolvem inflamação intestinal fatal (CHAUDHRY *et al.*, 2009).



**Figura 5 – Representação dos mecanismos de supressão utilizados por células Tregs.** Os mecanismos propostos de imunossupressão utilizados pelas Tregs podem ser: a produção de citocinas anti-inflamatórias IL10, IL35 e TGF $\beta$  (TGF $\beta$  quando ligado à membrana é conhecido como LAP), produção de granzima citolítica B, produção de IL10 e TGF $\beta$  mediada por TIGIT; regulação negativa das células dendríticas (DCs) mediada por LAG3, a interação de CTLA4 com CD80/CD86 impedindo a co-estimulação de CD28, indução da expressão de IDO por DCs, a produção de adenosina pelas ectoenzimas imunossupressora de superfície celular CD39 e CD73, captação de IL2 pelas Tregs utilizando receptor de alta afinidade para IL2 (CD25) produzida por células efectoras dependentes de IL2, e indução da produção de IL10 por células T não reguladoras. Fonte: Gwilz 11 July 2017. Adaptado de (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). (Acessado em 07/05/2018).

Surpreendentemente há poucos estudos acerca da funcionalidade e influência imunopatológica das células Treg em indivíduos acometidos com dengue. Um estudo demonstrou que as células Treg de pacientes com dengue possuem capacidade de suprimir a produção de citocinas pro-inflamatórias após estimulação específica por peptídeos de DENV *in vitro* (LUHN *et*

*al.*, 2007). Além disso, verificou-se que existe um desbalanço na razão da frequência de células Treg/células T efectoras, e esta razão é significativamente elevada em pacientes com dengue sem sinais de alarme, mas não em dengue grave, o que sugere um papel importante no controle da imunopatologia encontrada em DG (LUHN *et al.*, 2007). Outro trabalho demonstrou uma expansão significativamente maior de Tregs durante a fase aguda de dengue sem sinais de alarme comparado com dengue grave, bem como foi maior em pacientes acometidos por uma infecção primária de dengue (TILLU *et al.*, 2015). E um trabalho recente verificou que durante a fase aguda, pacientes com dengue apresentaram predominantemente a presença de Tregs tímicas (CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup>CCR4<sup>-</sup>), e uma baixa frequência de Tregs efectoras (CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>high</sup>CCR4<sup>+</sup>) que apresentam elevada capacidade supressiva (JAYARATNE *et al.*, 2017).

O campo de investigação da imunopatologia da dengue é bem amplo, por outro lado, a literatura atual carece de dados relacionados à regulação das respostas imunes durante a infecção por dengue. Visto que a dengue é um importante problema de saúde mundial, e que as teorias que explicam suas formas graves sugerem que a falta de controle da resposta inflamatória contribui diretamente para fisiopatologia da dengue, torna-se de extrema importância estudar detalhadamente os mecanismos regulatórios que poderiam controlar esta resposta exacerbada. Esta é uma área ainda pouco explorada, cujo estudo gerará conhecimentos para a melhor compreensão da modulação da resposta imune que leva ao desenvolvimento da dengue grave ou à resistência à doença.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar e comparar o perfil da regulação da resposta imune mediado pelas células T multifuncionais e células Tregs entre os pacientes com dengue leve e dengue sa+/grave, tanto durante a fase crítica (entre 6-12 dias após início dos sintomas) quanto no período de convalescência (30 dias após início da febre).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o perfil de citocinas inflamatórias em pacientes com dengue leve e dengue sa+/grave.
- Verificar a produção de citocinas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicos ao DENV.
- Investigar os linfócitos T simples, duplo ou triplo produtores de IFN $\gamma$ , TNF e IL10.
- Comparar os níveis de citocinas produzidas entre as células T que produzem uma, duas ou mais citocinas.
- Investigar o estado de ativação dos subtipos de linfócitos T (efetoras, memória, naive e TAMRA) e a expressão de moléculas reguladoras como CD200, GITR, LAP e PD1.
- Caracterizar o estado funcional das células Tregs através da expressão de moléculas reguladoras, como CD200, GITR, LAP, PD1, CTLA4, LAG3 e CD226, e também pela produção da citocina anti-inflamatória IL10.
- Verificar se as Tregs produtoras de IL10 expressam Tbet, que demonstraria um direcionamento na regulação de um perfil de resposta do tipo Th1 (Tbet<sup>+</sup>).
- Verificar se há proliferação das células Tregs IL10<sup>+</sup> após estímulo antigênico determinado pelo aumento da proteína nuclear Ki67<sup>hi</sup>.
- Investigar a origem das células Tregs produtoras de IL10 através da expressão do fator de transcrição Helios, ou seja, se Helios<sup>+</sup> são tTregs, se Helios<sup>-</sup> são iTregs.
- Realizar o mapeamento de epitopo da biblioteca de peptídeos imunogênicos às Tregs produtoras de IL10

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Recrutamento de Voluntários, informações clínicas.

Este estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou, Fiocruz-MG (CAAE: 30492014.9.0000.5091). Os trabalhos experimentais foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e no Laboratório de Imunopatologia da Fundação Osvaldo Cruz – Centro de Pesquisa René Rachou em Minas Gerais.

Os voluntários convidados a participar deste Projeto, entre os anos de 2013 a 2019, residem em Belo Horizonte –MG e São José do Rio Preto – SP, e foram devidamente informados acerca deste ou responsáveis legais (no caso de um participante menor de idade) e assinaram Termo de Consentimento (Anexo 1), antes de sua inscrição no estudo. O recrutamento de indivíduos saudáveis foi realizado na comunidade. Os voluntários com suspeita de dengue (pacientes ambulatoriais) foram recrutados no Centro de Saúde Jardim Montanhês, Hospital Santo Ivo e Hospital de Base de São José do Rio Preto. Os pacientes internados foram recrutados no Hospital Metropolitano Odilon Behrens, Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, e Hospital de Base de São José do Rio Preto.

A classificação clínica dos pacientes sintomáticos foi realizada de acordo com as diretrizes da WHO 2009 pelo aluno no momento do consentimento, o qual também foi responsável por coletar sintomas da doença e evolução, resultados do hemograma e volume plaquetário, quando disponíveis os prontuários. A classificação foi revisada retrospectivamente por um médico independente. Neste trabalho os casos de dengue foram classificados em dois grupos: a) dengue leve que recebeu tratamento ambulatorial; b) pacientes internados apresentando dengue com sinais de alarme (sa+) e dengue grave. Portanto os grupos foram denominados de a) dengue leve e b) sa+/grave.

#### 3.2. Coleta e processamento de amostras

As amostras de sangue periférico (40-60mL) foram coletadas em tubos coletores a vácuo heparinizados e realizadas em três momentos diferentes: 3-4 dias após o início dos sintomas (período febril), 6-12 dias após o início dos sintomas (fase crítica, período de internação) e mais de 30 dias após o início dos sintomas (período convalescência).



No mesmo dia da coleta, plasma e PBMC (células mononucleares do sangue periférico) foram separados por centrifugação utilizando gradiente de Ficoll Hipaque (SIGMA). Quando necessário, as amostras foram mantidas a 4°C até o momento do processamento. As amostras de plasma foram armazenadas em freezer -80°C, e as células lavadas, contadas e ressuspensas em meio DMEM + 10% Soro Bovino Fetal (SBF) (Cultilab, Lote 013/13) e congeladas em meio de congelamento SBF + 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (SIGMA). As células foram mantidas por cerca de 24 h a -80°C e então transferidas para um botijão contendo nitrogênio líquido (-196°C) até o uso.

### 3.3 Cultura de Células e Vírus

As células C6/36, da larva do mosquito *Aedes albopictus*, foram utilizadas para aumento de título viral. As células C6/36 foram cultivadas em meio Leibovitz contendo 5% de SBF e 1% de Penicilina/Estreptomicina. Ao atingirem cerca 95% de confluência, estas células foram infectadas com 4 sorotipos DENV separadamente e cultivadas por 10 dias. Após término deste período o sobrenadante da cultura infectada foi coletado, centrifugado, separado do pellet celular, homogeneizado, aliquoteado e congelado a -196°C.

A cultura das células BHK-21, fibroblastos de rim do hamster *Mesocricetus auratus*, foi utilizada para verificação do título viral. As células BHK-21 foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% SBF, 1% Penicilina/Estreptomicina e 1% Anfotericina B. As células BHK-21 foram semeadas em placas de cultura estéreis de 6 poços (quantidade suficiente para atingir confluência de 95% no dia seguinte). Após cerca de 24h, as células foram infectadas com 4 sorotipos virais separadamente e incubadas por 5 dias em estufa úmida com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Após o término de incubação, as células foram fixadas utilizando solução de paraformaldeído 10% tamponado e deixadas em temperatura ambiente por cerca de 24h. As células foram coradas por 5 minutos utilizando solução de cristal violeta. Fez-se a contagem de placas de lise e cálculos para determinação do título viral.

### 3.4 Diagnóstico Molecular

O RNA foi extraído do sobrenadante de cultura de C6/36 infectado com 1 dos 4 sorotipos, para serem utilizados como curva padrão do PCR quantitativo (qPCR), e do plasma/soro dos pacientes utilizando o PureLink Viral RNA/DNA Kits (INVITROGEN).

A tipagem e carga viral no sangue foram realizadas por qPCR em tempo real utilizando o kit SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR Sytem with ROX (INVITROGEN) de acordo com as instruções do fabricante, na presença de oligos iniciadores e sondas descritos anteriormente (Tabela 2) (HUE *et al.*, 2011). Foi adicionado 1U/ $\mu$ L de heparinase quando necessário para evitar propriedades inibidoras da heparina na polimerase (JOHNSON *et al.*, 2003). As reações foram processadas no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems). O programa utilizado para reação foi o SDS 2.4, com os seguintes ciclos: 25°C/60min (para ação da heparinase); 60°C/15min; 95°C/2min; e 45 ciclos de 95°C/15seg. e 60°C/1min. O nível de expressão do RNA foi determinado baseado na curva padrão que utilizou o RNA viral extraído da cultura de células C6/36 infectadas com 1 dos 4 sorotipos virais.

**Tabela 2 – Oligo e sondas utilizadas**

Sorotipos	Sequência dos primers e sondas (5'-3')
DENV1-F	ATCCATGCCCAACCAAT
DENV1-R	TGTGGGTTTTGTCCTCCATC
DENV1-Sonda	<b>FAM-TCAGTGTGGAATAGGGTTTGGATAGAGGAA-TAMRA</b>
DENV2-F	TCCATACACGCCAAACATGAA
DENV2-R	GGGATTTCCCTCCCATGATTCC
DENV2-Sonda	<b>FAM-AGGGTGTGGATTTCGAGAAAACCCATGG-TAMRA</b>
DENV3-F	TTTCTGCTCCCACCACTTTC
DENV3-R	CCATCCYGCTCCTTGAGA
DENV3-Sonda	<b>TET-AAGAAAGTTGGTAGTTCCCTGCAGACCCCA-TAMRA</b>
DENV4-F	GYGTGGTGAAGCCYCTRGAT
DENV4-R	AGTGARCGCCATCCTTCAT
DENV4-Sonda	<b>TET-ACTTCCCTCCTCTTYTTGAACGACATGGGA-TAMRA</b>

### 3.5 Diagnóstico sorológico, infecção secundária e critérios de inclusão

Todos os indivíduos incluídos na pesquisa foram submetidos a testes sorológicos para dengue. O diagnóstico sorológico para detecção de IgM (amostras preferencialmente entre 6-12 dias, mas em casos que não havia amostra nesta fase crítica, foi realizado com a amostra do primeiro tempo de 3-5 dias) e IgG (amostras na fase febril e crítica, e também período de convalescência) foi realizado utilizando o kit ELISA PanBio (Inverness Medical Innovations Australia Pty Ltd) de acordo com as normas do fabricante. A leitura foi realizada no equipamento

Espectra MAX Plus (Molecular Devices) utilizando o programa SoftMaxPro. Amostras reativas para IgG durante os primeiros 7 dias de sintomas foram considerados casos de infecção secundária. Os indivíduos foram incluídos neste estudo se positivos para infecção por dengue quando detectado IgM nos primeiros 7 dias de sintomas ou quando amostras de sangue foram positivas para PCR para dengue. Controles saudáveis estavam livres de sintomas e negativos para IgM e IgG específicos para dengue. Foram excluídos da pesquisa amostras cujo resultado de IgM foi indeterminado e não houve amplificação de DNA no ensaio de RT-PCR.

### 3.6 Dosagem de citocinas plasmáticas

A quantificação de citocinas circulantes em plasma descongelado pela primeira vez foi feita utilizando os Kits de CBA Humano da BD de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram adquiridos no equipamento BD FACSVerse utilizando o software BD FACSuite.

### 3.7 Biblioteca de Peptídeos e Pools para Mapeamento de Epitopo

Os peptídeos foram obtidos da Mimotopes (Mulgrave, Austrália) e as bibliotecas peptídicas foram construídas com peptídeos sequenciais de 15a.a. com deslocamento de 5a.a. (>70% de pureza), abrangendo totalmente a sequência primária das proteínas Envelope (ENV) e NS3 de DENV1 (NP 059433.1). As bibliotecas continham 97 e 123 peptídeos, respectivamente para ENV (NP 722460.2) e NS3 (NP 722463) de DENV1 (Tabela 3). Os peptídeos foram reconstituídos em DMSO (20mg/mL) e utilizados na concentração final de 2µg/mL em cada ensaio. Para o mapeamento de epitopos, pools de peptídeos de ENV DENV1 foram preparados seguindo a sequência de peptídeos, sendo que os pools de 1 ao 9 continham 10 peptídeos cada e o 10º pool continha os últimos 7 peptídeos.

**Tabela 3 – Sequência de a.a. dos peptídeos das bibliotecas de ENV e NS3 de DENV1**

Biblioteca ENV DENV1			Biblioteca NS3 DENV1	
Pools	ID	Sequência do Peptídeo	ID	Sequência do Peptídeo
Pool nº 1	ENV-DV1-1	MRCVGIGNRDFVEGL	NS3-DV1.1	SGVLWDTSPPEVER
	ENV-DV1-2	IGNRDFVEGLSGATW	NS3-DV1.2	DTPSPPEVERAVLDD
	ENV-DV1-3	FVEGLSGATWVDVVL	NS3-DV1.3	PEVERAVLDDGIYRI
	ENV-DV1-4	SGATWVDVVLVLEHGSC	NS3-DV1.4	AVLDDGIYRILQRGL

Pool n° 2	ENV-DV1-5	VDVVLEHGSCVTTMA	NS3-DV1.5	GIYRILQRGLLGRSQ
	ENV-DV1-6	EHGSCVTTMAKNKPT	NS3-DV1.6	LQRGLLGRSQVGVGV
	ENV-DV1-7	VTTMAKNKPTLDIEL	NS3-DV1.7	LGRSQVGVGVFQEGV
	ENV-DV1-8	KNKPTLDIELLKTEV	NS3-DV1.8	VGVGVFQEGVFHTMW
	ENV-DV1-9	LDIELLKTEVTNPAV	NS3-DV1.9	FQEGVFHTMWHVTRG
	ENV-DV1-10	LKTEVTNPAVLRKLC	NS3-DV1.10	FHTMWHVTRGAVLMY
	ENV-DV1-11	TNPAVLRKLCIEAKI	NS3-DV1.11	HVTRGAVLMYQGKRL
	ENV-DV1-12	LRKLCIEAKISNTTT	NS3-DV1.12	AVLMYQGKRLEPSWA
	ENV-DV1-13	IEAKISNTTTDSRCP	NS3-DV1.13	QGKRLEPSWASVKKD
	ENV-DV1-14	SNTTTDSRCPTQGEA	NS3-DV1.14	EPSWASVKKDLISYG
Pool n° 3	ENV-DV1-15	DSRCPTQGEATLVEE	NS3-DV1.15	SVKKDLISYGGGWRWF
	ENV-DV1-16	TQGEATLVEEQDANF	NS3-DV1.16	LISYGGGWRWFQGSWN
	ENV-DV1-17	TLVEEQDANFVCRRT	NS3-DV1.17	GGWRWFQGSWNAGEEV
	ENV-DV1-18	QDANFVCRRTFVDRG	NS3-DV1.18	QGSWNAGEEVQVIAV
	ENV-DV1-19	VCRRTFVDRGWGNGC	NS3-DV1.19	AGEEVQVIAVEPGKN
	ENV-DV1-20	FVDRGWGNGCGLFGK	NS3-DV1.20	QVIAVEPGKNPKNVQ
	ENV-DV1-21	WGNGCGLFGKGSLLT	NS3-DV1.21	EPGKNPKNVQTAPGT
	ENV-DV1-22	GLFGKGSLLTCAKFK	NS3-DV1.22	PKNVQTAPGTFKTPE
	ENV-DV1-23	GSLLTCAKFKCVTKL	NS3-DV1.23	TAPGTFKTPEGEVGA
	ENV-DV1-24	CAKFKCVTKLEGKIV	NS3-DV1.24	FKTPEGEVGAIALDF
Pool n° 4	ENV-DV1-25	CVTKLEGKIVQYENL	NS3-DV1.25	GEVGAIALDFKPGTS
	ENV-DV1-26	EGKIVQYENLKYSVI	NS3-DV1.26	IALDFKPGTSGSPIV
	ENV-DV1-27	QYENLKYSVIVTVHT	NS3-DV1.27	KPGTSGSPIVNREGK
	ENV-DV1-28	KYSVIVTVHTGDQHQ	NS3-DV1.28	GSPIVNREGKIVGLY
	ENV-DV1-29	VTVHTGDQHQVGNET	NS3-DV1.29	NREGKIVGLYGNGVV
	ENV-DV1-30	GDQHQVGNETTEHGT	NS3-DV1.30	IVGLYGNGVVTTSGT
	ENV-DV1-31	VGNETTEHGTIATIT	NS3-DV1.31	GNGVVTTSGTYVSAI
	ENV-DV1-32	TEHGTIATITPQAPT	NS3-DV1.32	TTSPTYVSAIAQAKA
	ENV-DV1-33	IATITPQAPTSEIQL	NS3-DV1.33	YVSAIAQAKASQEGP
	ENV-DV1-34	PQAPTSEIQLIDYGA	NS3-DV1.34	AQAKASQEGPLPEIE
ENV-DV1-35	SEIQLIDYGALTLDC	NS3-DV1.35	SQEGPLPEIEDEVFR	
ENV-DV1-36	IDYGALTLDCSPRTG	NS3-DV1.36	LPEIEDEVFRKRNL	
ENV-DV1-37	LTLDCSPRTGLDFNE	NS3-DV1.37	DEVFRKRNLTIMDLH	
ENV-DV1-38	SPRTGLDFNEMVLLT	NS3-DV1.38	KRNLTIMDLHPGSGK	
ENV-DV1-39	LDFNEMVLLTMKGKS	NS3-DV1.39	IMDLHPGSGKTRRYL	
ENV-DV1-40	MVLLTMKGKSWLVHK	NS3-DV1.40	PGSGKTRRYLPAIVR	

<b>Pool n° 5</b>	<b>ENV-DV1-41</b>	MKGKSWLVHKQWFLD	<b>NS3-DV1.41</b>	TRRYLPAIVREAIKR
	<b>ENV-DV1-42</b>	WLVHKQWFLDLPLPW	<b>NS3-DV1.42</b>	PAIVREAIKRKLRTL
	<b>ENV-DV1-43</b>	QWFLDLPLPWTSGAS	<b>NS3-DV1.43</b>	EAIKRKLRTLVLAPT
	<b>ENV-DV1-44</b>	LPLPWTSGASTSQET	<b>NS3-DV1.44</b>	KLRTLVLAPTRVVAS
	<b>ENV-DV1-45</b>	TSGASTSQETWNRQD	<b>NS3-DV1.45</b>	VLAPTRVVASEMAEA
	<b>ENV-DV1-46</b>	TSQETWNRQDLLVTF	<b>NS3-DV1.46</b>	RVVASEMAEALKGMP
	<b>ENV-DV1-47</b>	WNRQDLLVTFKTAHA	<b>NS3-DV1.47</b>	EMAEALKGMPIRYQT
	<b>ENV-DV1-48</b>	LLVTFKTAHAKKQEV	<b>NS3-DV1.48</b>	LKGMPIRYQTTAVKS
	<b>ENV-DV1-49</b>	KTAHAKKQEVVVLGS	<b>NS3-DV1.49</b>	IRYQTTAVKSEHTGK
	<b>ENV-DV1-50</b>	KKQEVVVLGSQEGAM	<b>NS3-DV1.50</b>	TAVKSEHTGKEIVDL
<b>Pool n° 6</b>	<b>ENV-DV1-51</b>	VVLGSQEGAMHTALT	<b>NS3-DV1.51</b>	EHTGKEIVDLMCHAT
	<b>ENV-DV1-52</b>	QEGAMHTALTGATEI	<b>NS3-DV1.52</b>	EIVDLMCHATFTMRL
	<b>ENV-DV1-53</b>	HTALTGATEIQTSGT	<b>NS3-DV1.53</b>	MCHATFTMRLSPVR
	<b>ENV-DV1-54</b>	GATEIQTSGTTTIFA	<b>NS3-DV1.54</b>	FTMRLSPVRVPNYM
	<b>ENV-DV1-55</b>	QTSGTTTIFAGHLKC	<b>NS3-DV1.55</b>	LSPVRVPNYMIIMDE
	<b>ENV-DV1-56</b>	TTIFAGHLKCRLKMD	<b>NS3-DV1.56</b>	VPNYMIIMDEAHFTD
	<b>ENV-DV1-57</b>	GHLKRLKMDKLTLLK	<b>NS3-DV1.57</b>	IIMDEAHFTDPASIA
	<b>ENV-DV1-58</b>	RLKMDKLTLLKMSYV	<b>NS3-DV1.58</b>	AHFTDPASIAARGYI
	<b>ENV-DV1-59</b>	KLTLKMSYVMCTGS	<b>NS3-DV1.59</b>	PASIAARGYISTRVG
	<b>ENV-DV1-60</b>	GMSYVMCTGSFKLEK	<b>NS3-DV1.60</b>	ARGYISTRVGMGEAA
<b>Pool n° 7</b>	<b>ENV-DV1-61</b>	MCTGSFKLEKEVAET	<b>NS3-DV1.61</b>	STRVGMGEAAAIFMT
	<b>ENV-DV1-62</b>	FKLEKEVAETQHGTV	<b>NS3-DV1.62</b>	MGEAAAIFMTATPPG
	<b>ENV-DV1-63</b>	EVAETQHGTVLVQVK	<b>NS3-DV1.63</b>	AIFMTATPPGSVEAF
	<b>ENV-DV1-64</b>	QHGTVLVQVKYEGTD	<b>NS3-DV1.64</b>	ATPPGSVEAFPQSNA
	<b>ENV-DV1-65</b>	LVQVKYEGTDAPCKI	<b>NS3-DV1.65</b>	SVEAFPQSNAVIQDE
	<b>ENV-DV1-66</b>	YEGTDAPCKIPFSTQ	<b>NS3-DV1.66</b>	PQSNAVIQDEERDIP
	<b>ENV-DV1-67</b>	APCKIPFSTQDEKGV	<b>NS3-DV1.67</b>	VIQDEERDIPERSWN
	<b>ENV-DV1-68</b>	PFSTQDEKGVTONGR	<b>NS3-DV1.68</b>	ERDIPERSWNSGYDW
	<b>ENV-DV1-69</b>	DEKGVTONGRLITAN	<b>NS3-DV1.69</b>	ERSWNSGYDWITDFP
	<b>ENV-DV1-70</b>	TQNGRLITANPIVTD	<b>NS3-DV1.70</b>	SGYDWITDFPGKTVW
<b>Pool n° 8</b>	<b>ENV-DV1-71</b>	LITANPIVTDKEKPV	<b>NS3-DV1.71</b>	ITDFPGKTVWFVPSI
	<b>ENV-DV1-72</b>	PIVTDKEKPVNIETE	<b>NS3-DV1.72</b>	GKTVWFVPSIKSGND
	<b>ENV-DV1-73</b>	KEKPVNIETEPFGE	<b>NS3-DV1.73</b>	FVPSIKSGNDIANCL
	<b>ENV-DV1-74</b>	NIETEPFGESYIVV	<b>NS3-DV1.74</b>	KSGNDIANCLRKNGK
	<b>ENV-DV1-75</b>	PPFGESYIVVGAGEK	<b>NS3-DV1.75</b>	IANCLRKNGKRVVQL
	<b>ENV-DV1-76</b>	SYIVVGAGEKALKLS	<b>NS3-DV1.76</b>	RKNGKRVVQLSRKTF

	<b>ENV-DV1-77</b>	GAGEKALKLSWFKKG	<b>NS3-DV1.77</b>	RVVQLSRKTFDTEYQ
	<b>ENV-DV1-78</b>	ALKLSWFKKGSSIGK	<b>NS3-DV1.78</b>	SRKTFDTEYQKTKNN
	<b>ENV-DV1-79</b>	WFKKGSSIGKMFEAT	<b>NS3-DV1.79</b>	DTEYQKTKNNNDWDYV
	<b>ENV-DV1-80</b>	SSIGKMFEATARGAR	<b>NS3-DV1.80</b>	KTKNNNDWDYVVTTDI
<b>Pool n° 9</b>	<b>ENV-DV1-81</b>	MFEATARGARRMAIL	<b>NS3-DV1.81</b>	DWDYVVTTDISEMGA
	<b>ENV-DV1-82</b>	ARGARRMAILGDTAW	<b>NS3-DV1.82</b>	VTTDISEMGANFRAD
	<b>ENV-DV1-83</b>	RMAILGDTAWDFGSI	<b>NS3-DV1.83</b>	SEMGANFRADRVIDP
	<b>ENV-DV1-84</b>	GDTAWDFGSIGGVFT	<b>NS3-DV1.84</b>	NFRADRVIDPRRCLK
	<b>ENV-DV1-85</b>	DFGSIGGVFTSVGKL	<b>NS3-DV1.85</b>	RVIDPRRCLKPVILK
	<b>ENV-DV1-86</b>	GGVFTSVGKLTHQVF	<b>NS3-DV1.86</b>	RRCLKPVILKDGPER
	<b>ENV-DV1-87</b>	SVGKLTHQVFGTAYG	<b>NS3-DV1.87</b>	PVILKDGPERVILAG
	<b>ENV-DV1-88</b>	THQVFGTAYGVLFSG	<b>NS3-DV1.88</b>	DGPERVILAGPMPVT
	<b>ENV-DV1-89</b>	GTAYGVLFSGVSWTM	<b>NS3-DV1.89</b>	VILAGPMPVTVASAA
	<b>ENV-DV1-90</b>	VLFSGVSWTMKIGIG	<b>NS3-DV1.90</b>	PMPVTVASAAQRRGR
<b>Pool n° 10</b>	<b>ENV-DV1-91</b>	VSWTMKIGIGILLTW	<b>NS3-DV1.91</b>	VASAAQRRGRIGRNQ
	<b>ENV-DV1-92</b>	KIGIGILLTWLGLNS	<b>NS3-DV1.92</b>	QRRGRIGRNQNKEGD
	<b>ENV-DV1-93</b>	ILLTWLGLNSRSTSL	<b>NS3-DV1.93</b>	IGRNQNKEGDQYIYM
	<b>ENV-DV1-94</b>	LGLNSRSTLSMTCI	<b>NS3-DV1.94</b>	NKEGDQYIYMGQPLN
	<b>ENV-DV1-95</b>	RSTLSMTCIAVGMV	<b>NS3-DV1.95</b>	QYIYMGQPLNNDDEDH
	<b>ENV-DV1-96</b>	SMTCIAVGMVTLYLG	<b>NS3-DV1.96</b>	GQPLNNDDEDHAHWTE
	<b>ENV-DV1-97</b>	AVGMVTLYLGV MVQA	<b>NS3-DV1.97</b>	NDEDHAHWTEAKMLL
			<b>NS3-DV1.98</b>	AHWTEAKMLLDNINT
			<b>NS3-DV1.99</b>	AKMLLDNINTPEGII
			<b>NS3-DV1.100</b>	DNINTPEGIIPALFE
			<b>NS3-DV1.101</b>	PEGIIPALFEPEREK
			<b>NS3-DV1.102</b>	PALFEPEREKSAIID
			<b>NS3-DV1.103</b>	PEREKSAIDGELYRL
		<b>NS3-DV1.104</b>	SAAIDGELYRLRGAR	
		<b>NS3-DV1.105</b>	GEYRLRGEARKTFVE	
		<b>NS3-DV1.106</b>	RGEARKTFVELMRRG	
		<b>NS3-DV1.107</b>	KTFVELMRRGDLPVW	
		<b>NS3-DV1.108</b>	LMRRGDLPVWLSYKV	
		<b>NS3-DV1.109</b>	DLPVWLSYKVASEGF	
		<b>NS3-DV1.110</b>	LSYKVASEGFQYS DR	
		<b>NS3-DV1.111</b>	ASEGFQYSDRRWCFD	
		<b>NS3-DV1.112</b>	QYSDRRWCFDGERNN	
		<b>NS3-DV1.113</b>	RWCFDGERNNQVLEE	

<b>NS3-DV1.114</b>	GERNNQVLEENMDVE
<b>NS3-DV1.115</b>	QVLEENMDVEIWTKE
<b>NS3-DV1.116</b>	NMDVEIWTKEGERKK
<b>NS3-DV1.117</b>	IWTKEGERKKLRPRW
<b>NS3-DV1.118</b>	GERKKLRPRWLDART
<b>NS3-DV1.119</b>	LRPRWLDARTYSDPL
<b>NS3-DV1.120</b>	LDARTYSDPLALREF
<b>NS3-DV1.121</b>	YSDPLALREFKEFAA
<b>NS3-DV1.122</b>	ALREFKEFAAGRR
<b>NS3-DV1.123</b>	PLALREFKEFAAGRR

### 3.8 Avaliação de citocinas intracelulares e Imunofenotipagem

A análise das PBMC utilizando a técnica de Citometria de Fluxo permitiu identificar e caracterizar, por meio de 5 painéis distintos, células, moléculas reguladoras e citocinas que estão envolvidas na resposta contra infecção da dengue.

#### 3.8.1 Cultura de Células

As PBMC foram descongeladas em banho Maria a 37°C e lavadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) 10% SBF e 20U/mL benzonase nuclease (Novagen). Após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 com 10% SBF e distribuídas em poços de placas de cultura estéreis de 96 poços na concentração de  $0,5 \times 10^6$  células/poço (Painel de Subpopulações de células T e Painel de Tregs I) ou  $1,0 \times 10^6$  células/poço (Painel de Células T multifuncionais, Painel de Tregs II, Painel de Tregs III).

#### 3.8.2 Painel T de memória e Painel de Tregs I

Após o período de ambientação de 2 horas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, seguiu-se com o protocolo de marcação de citometria de fluxo para o painel de subpopulações de células T ou painel de Tregs I. As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) a 4°C e marcadas por 10 minutos em temperatura ambiente (TA) no escuro com Violet Live/Dead (ViViD) (Invitrogen), um indicador de viabilidade celular, que reage com aminas livres, tanto na superfície quanto no interior das células. Caso a célula tenha perdido a integridade de membrana, menor ou maior incorporação do ViViD pode ocorrer, o que distingue as células vivas das mortas, respectivamente. Em seguida foram lavadas com tampão FACS (PBS 1x com 2% de

SBF) e seguiu-se com a marcação extracelular, por 20 minutos em TA no escuro, do painel de subpopulações de células T (Tabela 4) ou painel de Tregs I (Tabela 5), cujo os anticorpos foram diluídos em tampão FACS.

**Tabela 4 - Painel de Subpopulações de células T**

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>	<b>Catálogo</b>
<i>Marcação Extracelular:</i>			
CD3	Qd655	invitrogen	Q10012
CD4	V500	BD	560768
CD8	APC	Ebioscience	17-0081-82
CD27	APC/H7	BD	560222
CD45RA	Alexa700	Biolegend	304120
CD127	PE	BD	557938
CD200	PE/Cy7	ebioscience	25-9200-42
GITR	FITC	ebioscience	53-5875-42
LAP	PERCP	R&D	FAB2463C
PD1	BV605	Biolegend	329923

**Tabela 5 - Painel de células Tregs I**

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>	<b>Catálogo</b>
<i>Marcação Extracelular:</i>			
CD3	Qd655	invitrogen	Q10012
CD4	V500	BD	560768
CD127	ef780	ebioscience	47-1278-41
CD25	AF700	BD	561398
LAG3	AF647	Biolegend	369304
CD226	PERCP/Cy5.5	Biolegend	338314
GITR	FITC	ebioscience	53-5875-41
<i>Marcação Intracelular:</i>			
FoxP3	PE/Dazzle	Biolegend	320126
CTLA4	PE-Cy7	Biolegend	349914



No caso do painel de Subpopulação de células T, as células foram lavadas com tampão FACS e fixadas com PFA 2% (Sigma) por 1 hora em TA ao abrigo da luz, lavadas com FACS e ressuspensas em FACS para aquisição no equipamento BD LSR-FORTESSA utilizando o software BD FACSDiva.

Com relação ao Painel de Tregs I, as células foram lavadas, fixadas e permeabilizadas por 20 minutos em TA ao abrigo da luz, utilizando o kit FoxP3 staining buffer Set (eBioscience) seguindo-se com a marcação intracelular dos anticorpos diluídos em tampão do kit FoxP3 por 45 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após marcação intracelular, as células foram lavadas 3 vezes com o tampão do kit FoxP3 e ressuspensas em FACS para aquisição no equipamento BD LSR-FORTESSA utilizando o software BD FACSDiva.

### 3.8.3 Painel de Células T multifuncionais, Painel de Tregs II e Painel de Tregs III

Após a ambientação de 2 horas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, as células foram incubadas por mais 10 horas em 4 condições experimentais distintas: a) ausência de estímulo, b) estímulo com biblioteca (pools ou peptídeos individuais) de peptídeos do ENV do DENV1 (2,0µg/mL), c) estímulo com biblioteca de peptídeos do NS3 do DENV1 (2,0µg/mL), e d) estímulo com anticorpos anti-CD3 (1,0µg/mL) (BD) e anti-CD28 (0,5µg/mL) (BD). Em todas as condições de cultura foi adicionado Brefeldina A (1,0 µg/mL) (BioLegend).

Terminado o período de incubação as células foram lavadas com PBS 1x a 4°C, marcadas com ViViD, lavadas e realizada a marcação extracelular do painel de Células T multifuncionais (Tabela 6), ou painel de Tregs II (Tabela 7) ou painel de Tregs III (Tabela 8). Após essa etapa, as células foram fixadas, permeabilizadas, lavadas, e seguiu-se com a marcação intracelular de seus respectivos painéis. Após marcação intracelular as células foram lavadas e ressuspensas em FACS para os dados serem adquiridos no equipamento BD LSR-FORTESSA utilizando o software BD FACSDiva.

**Tabela 6 - Painel de Células T multifuncionais**

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>	<b>Catálogo</b>
<i>Marcação Extracelular:</i>			
CD3	Qd655	invitrogen	Q10012
CD4	V500	BD	560768
CD8	Qd605	invitrogen	Q10009
<i>Marcação Intracelular:</i>			
TNF	PE/Alexa700	invitrogen	RHTNFA24
IL10	PE	ebioscience	12-7108-82
IL17A	PERCP/Cy5.5	ebioscience	45-7179
IFN $\gamma$	PE/Cy7	BD	557844
IL4	FITC	ebioscience	11-7049-42
IL13	FITC	Ebioscience	11-7139-42
IL2	APC	ebioscience	17-7029

**TABELA 7 - Painel Tregs II**

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Marca</b>	<b>Catálogo</b>
<i>Marcação Extracelular:</i>			
CD3	Qd655	invitrogen	Q10012
CD4	V500	BD	560768
CD127	ef780	ebioscience	47-1278-41
CD25	AF700	BD	561398
CD200	PE/Cy7	ebioscience	25-9200-42
GITR	FITC	ebioscience	53-5875-41
LAP	PERCP	R&D	FAB2463C
PD1	BV605	Biologend	329923
<i>Marcação Intracelular:</i>			
FoxP3	APC	ebioscience	17-4776-42
IL10	PE	ebioscience	12-7108-82

**TABELA 8 - Painel Tregs III**

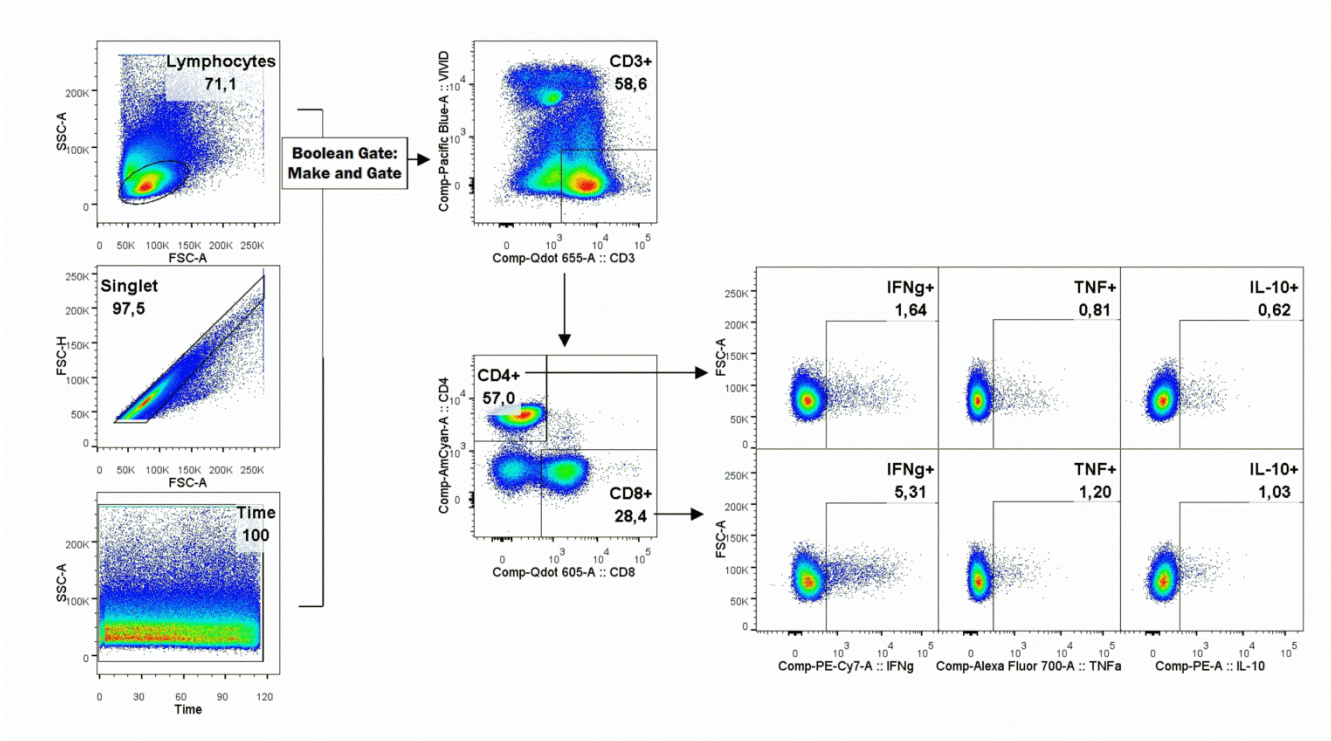
Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Catálogo
<i>Marcação Extracelular:</i>			
CD3	Qd655	Invitrogen	Q10012
CD4	V500	BD	560768
CD127	ef780	ebioscience	47-1278-41
CD25	AF700	BD	561398
<i>Marcação Intracelular:</i>			
FoxP3	APC	ebioscience	17-4776-42
IL10	PE	ebioscience	12-7108-82
Helios	PE/Dazzle	Biolegend	137232
Tbet	PERCP/Cy5.5	Biolegend	644824
Ki67	QD605	Biolegend	350522
IL17	PERCP/Cy5.5	ebioscience	45-7179

#### 3.8.4 Análises das citometrias de fluxo

As análises foram realizadas utilizando o Programa FlowJo versão 10 (LLC) e as estratégias de *gate* utilizadas estão demonstradas nas Figs. 6, 7 e 8, respectivamente, para os painéis de células T multifuncionais, painel de subpopulações de células T e painel de Tregs. A estratégia de *gate* utilizada para as análises dos painéis consiste primeiramente na seleção das populações de linfócitos (SSC-A x FSC-A), *singlets* (FSC-H x FSC-A), que é utilizado para exclusão de grumos celulares, e o *gate* de tempo (SSC-A x *Time*), para exclusão de eventuais interrupções de fluxo durante a aquisição. Em seguida, para obter uma interseção destes três *gates* iniciais (*Linfócitos*, *Singlet* e *Time*) foi utilizada a ferramenta *Boolean Gate*, opção *Make and Gate* do programa FlowJo, que deu origem ao *dot plot* utilizado no painel ViViD x CD3, onde foi selecionada a população de linfócitos T vivos (ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>) (Fig.6).

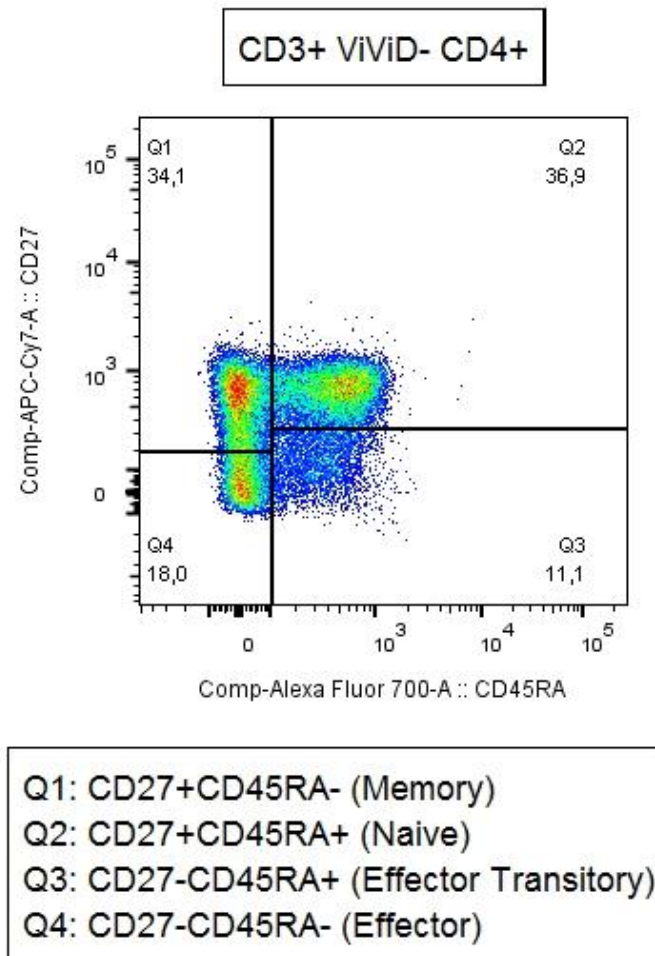
Para a análise do painel de células T multifuncionais, a partir do *gate* de células ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, foram selecionadas as subpopulações de linfócitos T CD4 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) e CD8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>). Em seguida foi determinado os *gates* para as citocinas IFN $\gamma$  TNF e IL10. Para verificar se as células T produziam uma destas citocinas (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>-</sup>IL10<sup>-</sup>, IFN $\gamma$ <sup>-</sup>TNF<sup>+</sup>IL10<sup>-</sup> ou IFN $\gamma$ <sup>-</sup>TNF<sup>-</sup>IL10<sup>+</sup>), ou duas (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>IL10<sup>-</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>-</sup>IL10<sup>+</sup> ou IFN $\gamma$ <sup>-</sup>TNF<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>), ou as três citocinas (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>) utilizamos a ferramenta *Boolean Gate: Create Combination Gates* do

programa. Amostras com menos de 20.000 eventos no portão ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> foram excluídas da análise.



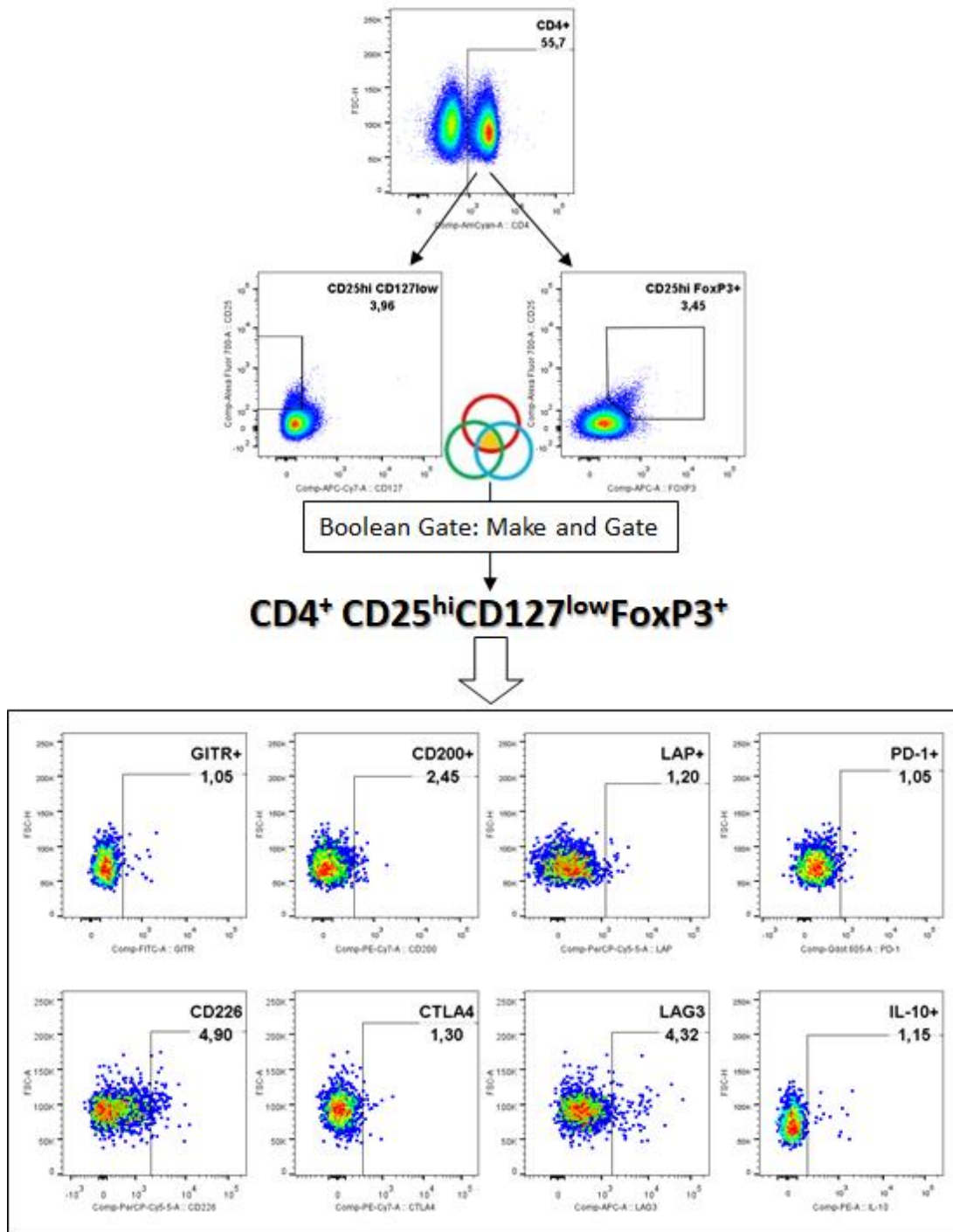
**Figura 6: Estratégia de gate do Pannel de Citocinas.** Foram selecionadas as populações de linfócitos, *singlets* e *time*. Em seguida, foi realizada a interseção desses três *gates* iniciais, para selecionar a população de células CD3<sup>+</sup> vivas (CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup>). Dentro de CD3<sup>+</sup>, foram selecionadas as populações de CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) e CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), e os *gates* das citocinas (IFN $\gamma$ , TNF e IL10) foram selecionadas a partir dessas populações.

A partir do *gate* de células ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, para o Pannel de subpopulações de células T (Fig.7) foram selecionadas as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Dentro de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram selecionados os *gates* das moléculas reguladoras CD127, CD200, GITR, LAP e PD1, e também os *gates* de quatro estados funcionais das células T: CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, CD27<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> e CD27<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>. Os *gates* das moléculas reguladoras selecionados em CD4<sup>+</sup> e em CD8<sup>+</sup> foram então transferidos para suas respectivas subpopulações de estados funcionais.



**Figura 7 – Estratégia de análise das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Dot plot representativo dos gates utilizados para determinar as células de memória (CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), naive (CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), efetora transitória (CD27<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) e efetora (CD27<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>). Q significa quadrante.

A começar da população de ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, para o Painel de Tregs, foi selecionado o *gate* da subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em seguida foram selecionados nos *dot plots* de CD25vs.FoxP3 a população duplo positiva CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> e no *dot plot* de CD25v.s.CD127 foi feito o *gate* da população CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>. Por meio do uso da ferramenta *Boolean Gate: Make and Gate* nestas populações selecionadas (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) foram definidas as células Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>). Enfim, os *gates* para CD200<sup>+</sup>, GITR<sup>+</sup>, LAP<sup>+</sup>, PD1<sup>+</sup>, CD226<sup>+</sup>, CTLA4<sup>+</sup>, LAG3<sup>+</sup> e IL10<sup>+</sup>, foram selecionados na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e estes foram transferidos inteiramente para a população de células Tregs. Amostras com menos de 100 eventos no *gate* de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> foram excluídas da análise.



**Figura 8 - Estratégia de Gate do Painel das células Tregs.** Dentro da população de células CD3<sup>+</sup> vivas (CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup>), fez-se o gate das células CD4<sup>+</sup>, e dentro deste grupo foram selecionadas as populações de CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>. Estes dois dot plots foram utilizados para obter as células Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>) através da ferramenta Boolean Gate: Make and Gate. Enfim, selecionou-se os gates para GITR<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, LAP<sup>+</sup>, PD1<sup>+</sup>, CD226<sup>+</sup>, CTLA4<sup>+</sup>, LAG3<sup>+</sup> e IL10<sup>+</sup> dentro do grupo de CD4<sup>+</sup> (não representados) e transferiu-se inteiramente para a população obtida de células Tregs como demonstrado na figura.

A começar da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, para avaliar células Tr1, foram excluídas as células CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> da população de células T CD4 total, através da ferramenta *Boolean Gate: Make Not Gate* dos *dot plots* de CD25v.s.FoxP3 e de CD25v.s.CD127, em seguida utilizou-se a ferramenta *Boolean Gate: Make and Gate* nas populações de CD4<sup>+</sup> total e CD25v.s.FoxP3<sup>neg</sup> e CD25v.s.CD127<sup>neg</sup> e obtivemos as Tr1 (CD4<sup>+</sup> (CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>)<sup>neg</sup>). Enfim, o *gate* para IL10<sup>+</sup> foi selecionado. Amostras com menos de 100 eventos no *gate* de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> foram excluídas da análise.

### 3.9 Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad PrismV6.05. Os resultados foram analisados utilizando os testes estatísticos: Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Wilcoxon, conforme indicado nas legendas das figuras. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativa quando  $P \leq 0.05$ . Os *outliers* foram retirados pelo método ROUT (Q = 2,0%) do programa GraphPad Prism V6.05.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados da coorte

O recrutamento dos controles e indivíduos com suspeita de dengue foi realizado nas áreas endêmicas de Belo Horizonte/MG e São Jose do Rio Preto/SP, Brasil entre os anos de 2013 e 2019. Os pacientes com dengue confirmada (n=93, 60% feminino) foram classificados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009). Neste trabalho os pacientes foram separados em dois grupos: dengue leve (tratados em casa ou ambulatoriais) e sa+/grave (pacientes internados com sinais de alarme e dengue grave). Os dados laboratoriais e as características clínicas são apresentados na Tabela 9. Não foi possível recuperar dados clínicos e laboratoriais detalhados de todos os pacientes, mas todos os pacientes deste estudo possuem classificação clínica, idade, gênero e testes diagnósticos.

A distribuição de idade e sexo foi semelhante entre os pacientes com dengue, embora os indivíduos que compõem o grupo controle sejam mais jovens, devido a exposição elevada da população a doença o que dificulta encontrar voluntários mais velhos não expostos a dengue (Tabela 9). O número de mulheres é semelhante entre os grupos controle e pacientes com dengue (Tabela 9). Ao avaliarmos se os pacientes foram acometidos por infecção secundária, por meio da presença de anticorpos IgG em amostras coletadas antes do 7º dia do início de sintomas, encontramos que 86% (37/43) dos pacientes com dengue sa+/grave apresentavam infecção secundária, significativamente maior que os pacientes com dengue leve 63% (34/54) (Tabela 9). Em relação a contagem de hemácias e valor de hematócrito não há diferenças entre os pacientes com dengue leve comparado com sa+/grave, porém pacientes com sa+/grave apresentam maior frequência de plaquetas abaixo de  $50.000/\text{mm}^3$  e menor nível plaquetário geral comparado com dengue leve (Tabela 9).



**Tabela 9 - Características gerais da coorte**

	<b>Controle (n=26)</b>	<b>Dengue Leve (n=54)</b>	<b>Sa+/grave (n=43)</b>
Idade <sup>a</sup>	28.0 (20-42)	35.5 (13-62)*	38.6 (13-79)*
Sexo (f)	65% (17/26)	57% (31/54)	58% (25/43)
RT-PCR	0% (0/26)	54% (29/54)	42% (18/43)
ELISA IgM	0% (0/26)	65% (35/54)	84% (36/43)
ELISA IgG (>30d)	0% (0/26)	67% (20/30)	92% (11/12)
Infecção secundária	—	63% (34/54)	86% (37/43) <sup>#</sup>
<b>Características laboratoriais dos pacientes com dengue</b>			
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>		4,758 (4,50 – 5,02)	4,309 (3,8 – 4,8)
Hematócrito (%) <sup>b</sup>		40,5 (38,3 – 42,7)	38,6 (35,9 – 41,3)
Plaquetas < 50.000/mm <sup>3</sup>		0% (0/25)	47% (13/28) <sup>#</sup>
Menor Contagem de Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>		125 (100 – 157)	56,9 (43 – 74) <sup>&amp;</sup>

a Média Geométrica (mín. – máx.)

b Média Geométrica (Intervalo de Confiança)

\* Kruskal-Wallis Test P=0.01

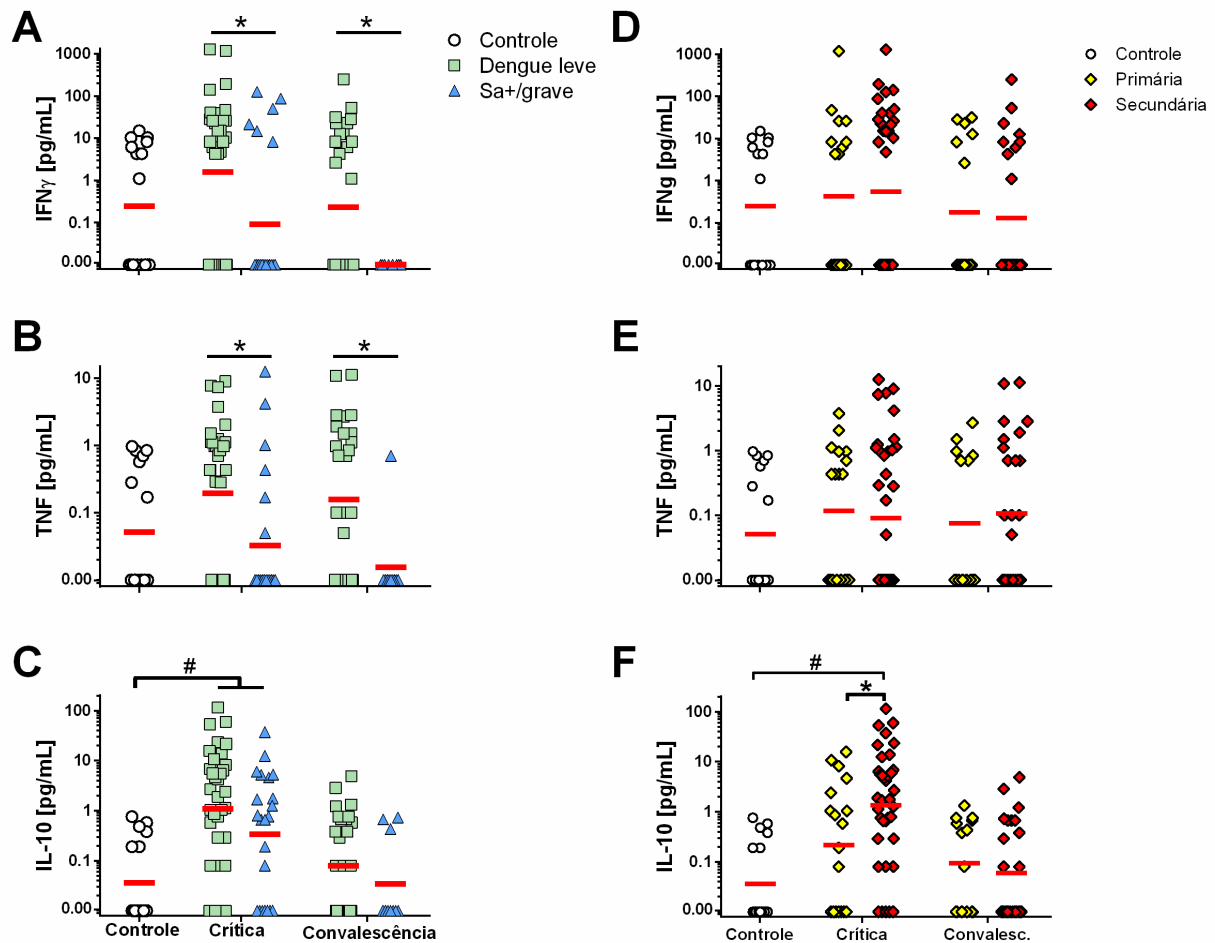
# Fisher's test P<0.01 (#)

& Mann Whitney Test P<0.0001

4.2 Indivíduos com sa+/grave dengue desenvolveram uma resposta inflamatória sistêmica escassa associada a altos níveis plasmáticos de IL10

A dengue grave está associada a uma hiperativação imune que leva ao extravasamento plasmático, e acredita-se que isto se deve principalmente aos elevados níveis de citocinas inflamatórias durante a Tempestade de Citocinas (ROTHMAN, 2011). Para avaliar o perfil inflamatório sistêmico durante as fases crítica e de convalescença da infecção por dengue, medimos IFN $\gamma$ , TNF e IL10 no plasma de controles e indivíduos com dengue leve e sa+/grave. Pacientes com dengue leve apresentaram níveis aumentados de IFN $\gamma$  e TNF quando comparado ao grupo sa+/grave, na fase crítica (Figs.9A e B). Na convalescência, os níveis dessas citocinas diminuíram, mas os indivíduos com dengue leve ainda apresentaram níveis mais elevados do que os pacientes com sa+/grave (Fig.9A e B). A infecção pela dengue foi associada ao aumento dos níveis plasmáticos de IL10 tanto em dengue leve quanto em sa+/grave, comparado com os controles

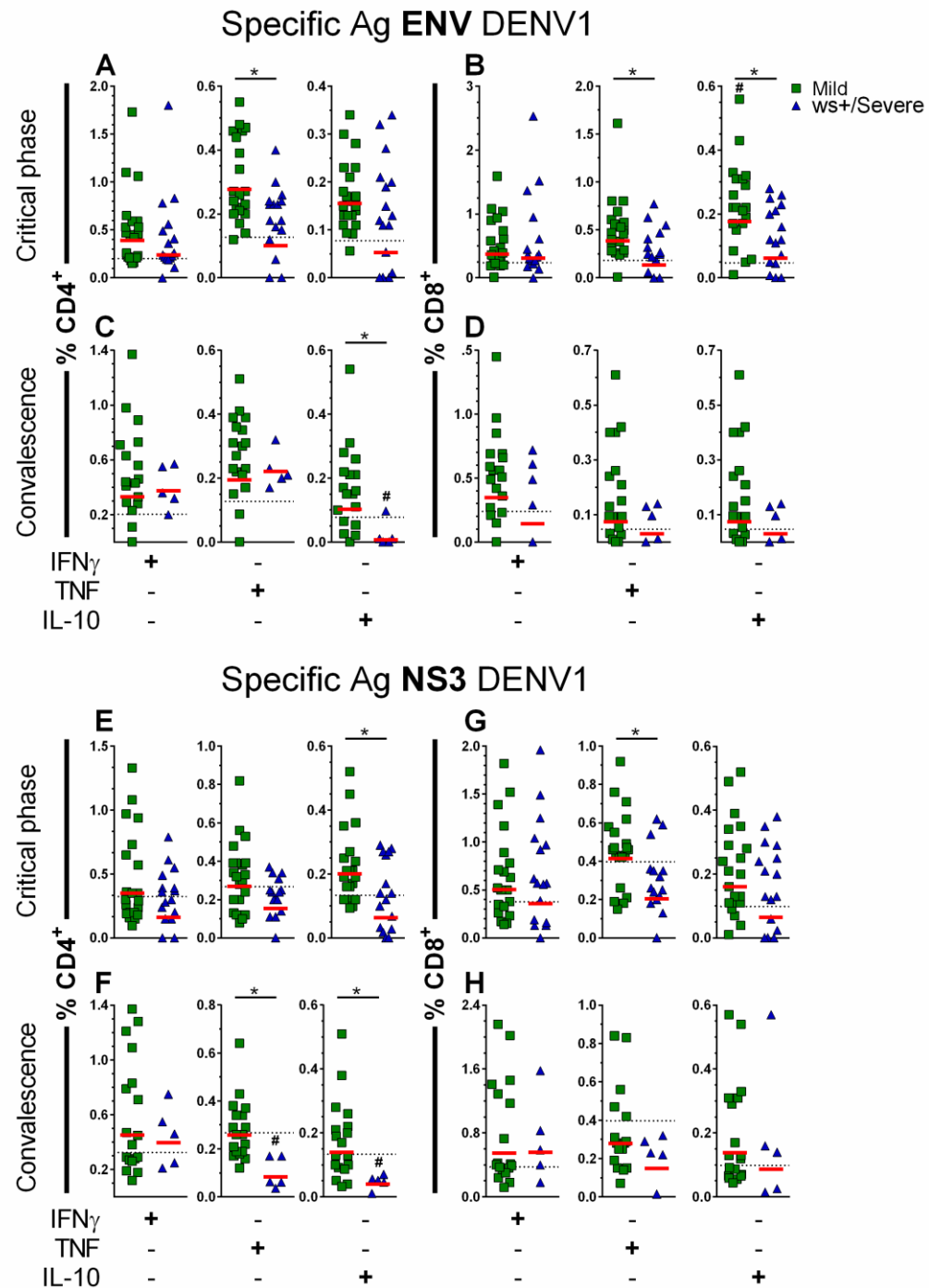
(Fig.9C) durante a fase crítica, retornando aos níveis basais na convalescência. É interessante que encontramos níveis semelhantes de IL10 plasmática entre os dengue leve e sa+/grave durante as fases crítica ou de convalescência (Fig.9C). Porém, encontramos que os pacientes com infecção secundária, durante o período crítico, apresentam níveis maiores de IL10 comparado com os que apresentavam infecção primária e controle (Fig.9F).



**Fig. 9. Níveis plasmáticos de IFN $\gamma$ , TNF e IL10.** IFN $\gamma$ , TNF e IL10 foram medidos no plasma de controles (círculo aberto) e pacientes com dengue leve (quadrado verde) e sa+/grave (triângulo azul) nas fases críticas (6-12 dias após o início da febre) e convalescência (mais 30 dias após o início da febre), conforme detalhado nos métodos. Cada símbolo representa um único indivíduo, as linhas vermelhas representam a Média Geométrica (GM). A significância estatística foi avaliada por Mann-Whitney (\* para  $P < 0.05$ ) e por Kruskal-Wallis (# para  $P < 0.05$ ). Controle n= 17. Durante a fase crítica dengue leve n= 33-35, sa+/grave n= 22. Convalescência dengue leve n= 31-32, sa+/grave n= 8-10.

4.3 Pacientes com dengue leve apresentaram frequências mais altas de células T produtoras de TNF e IL10, mas não de IFN $\gamma$ , específicas ao DENV quando comparadas a pacientes sa+/grave

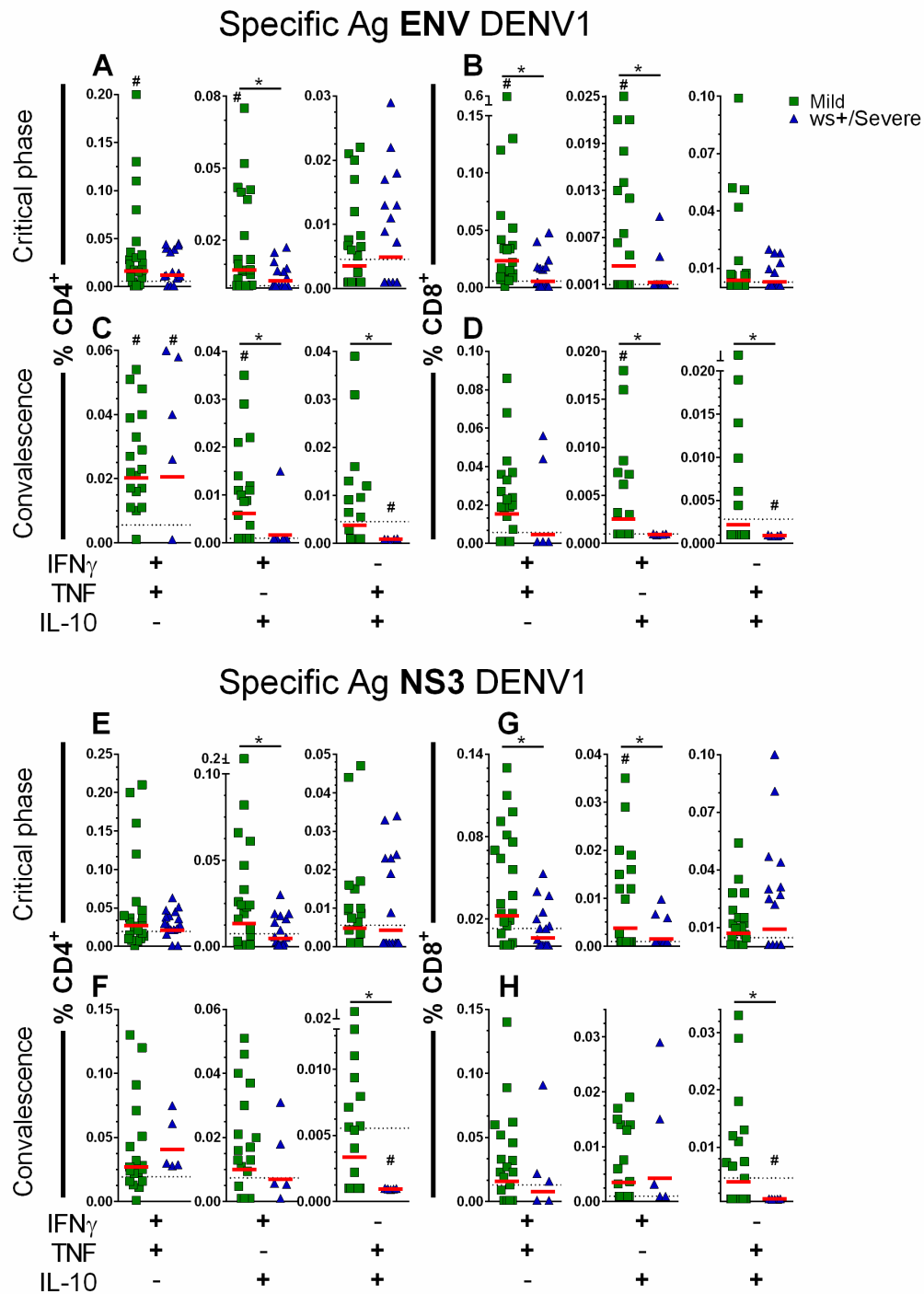
Durante uma infecção, o sistema imune inato e adaptativo são ativados para combater o agente agressor, e a resposta é direcionada de acordo com o tipo de estímulo. A fim de controlar a replicação viral, as células T produzem citocinas inflamatórias, como IFN $\gamma$  e TNF, que compõem respostas de perfil Th1, e reguladoras, como IL10 para prevenir exacerbação do processo inflamatório. Assim, para investigar a produção de citocinas pelas células T durante a infecção pela dengue, cultivamos PBMCs na presença de bibliotecas de peptídeos ENV ou NS3 de DENV1. Essas bibliotecas contêm a maior parte dos epitopos reconhecidos por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, sendo as proteínas mais imunogênicas do vírus dengue (DUANGCHINDA *et al.*, 2010; HATCH *et al.*, 2011). Primeiramente avaliamos se as bibliotecas de peptídeos estimulariam a produção de citocinas como IFN $\gamma$ , TNF e IL10 por células T simples produtoras. Os pacientes com dengue leve apresentaram maior frequência de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> simples produtoras de TNF (Figs.10A ou B) específicas ao ENV durante a fase crítica quando comparados com os pacientes com sa+/grave. Também há um aumento em pacientes com dengue leve na frequência de células T CD4<sup>+</sup> simples produtoras de IL10 (Fig.10E) ou CD8<sup>+</sup> simples produtoras de TNF (Fig.10G) ambas específicas ao NS3 durante a fase crítica quando comparado com o grupo sa+/grave. De modo importante, encontramos que a frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> simples produtores de IL10 específicos ao ENV são significativamente maiores em dengue leve durante a fase crítica comparado com sa+/grave e também com o controle não imune (Fig.10B). As frequências de células T CD4<sup>+</sup> simples produtoras de TNF e IL10 específicas ao DENV estão significativamente diminuídas em pacientes sa+/grave durante a fase de convalescência quando comparado com dengue leve e também com os controles não imunes (Figs.10C e F).



**Figura 10. Frequência de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> simples produtoras de IFN $\gamma$ , TNF ou IL10.** PBMC de pacientes com dengue leve (quadrado verde) e sa+/grave (triângulo azul) foram estimuladas com bibliotecas de peptídeos para ENV (A-D) e NS3 (E-H), durante as fases críticas e de convalescência da infecção. As frequências de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> simples produtoras de IFN $\gamma$ , TNF ou IL10 foram avaliadas por citometria de fluxo. As linhas vermelhas representam a GM. Linhas pontilhadas representam a GM do grupo de controle não infectado (N = 11-15). As diferenças entre os grupos de grupos infectados com DENV foram analisadas pelo teste estatístico de Mann-Whitney e são indicadas por asteriscos (\*) para P < 0.05. As comparações entre os grupos controle não-infectado e dengue foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis e são indicadas pelo sinal da cerquilha (#) para P < 0.05. Durante a fase crítica dengue leve n= 20-22, sa+/grave n= 14-16. Convalescência dengue leve n= 19-20, sa+/grave n= 4-5.

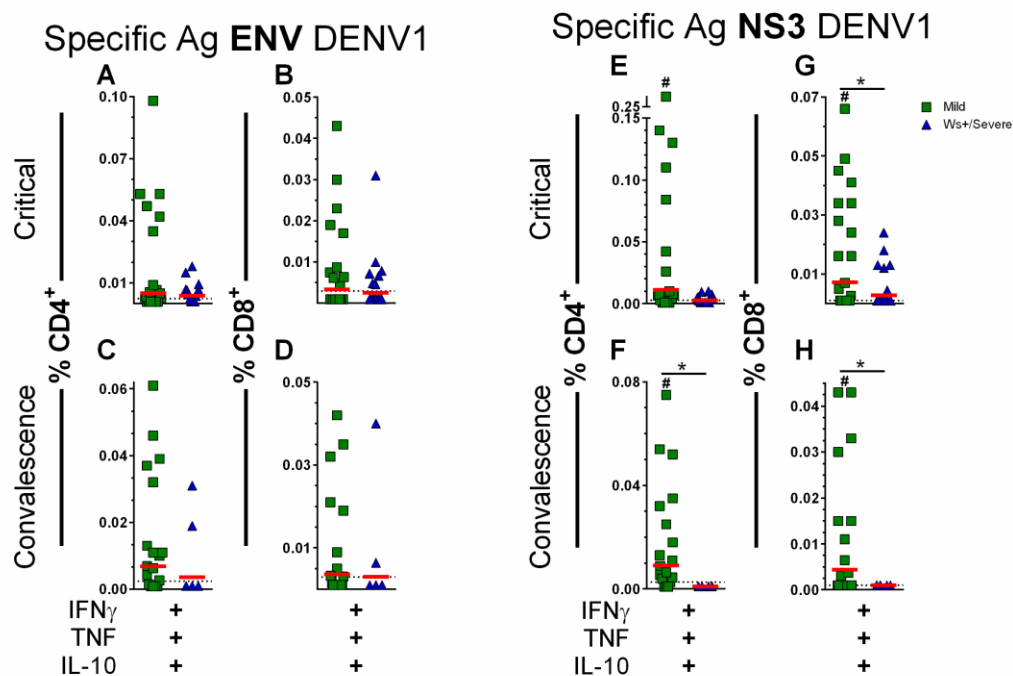
#### 4.4 Indivíduos com dengue leve apresentaram altas frequências de células T multifuncionais.

A produção de citocinas IFN $\gamma$ , TNF e/ou IL10 pelas células T multifuncionais foi avaliada após estimulação com as bibliotecas de peptídeos de ENV e NS3 de DENV1. De modo geral, notamos que, as frequências das células T duplo produtoras foram maiores em dengue leve, na fase crítica e na convalescência, comparado com o grupo controle (representado por #) (Figs.11A-D e G), diferentemente das células T simples produtoras. Por exemplo, a frequência de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN $\gamma$ /TNF específicas ao ENV são maiores em dengue leve na fase crítica comparado com controle (Fig.11A), bem como há um aumento desta população em pacientes com dengue, indiferente da classificação, durante a convalescência comparado com controle (Fig.11C). No período crítico, pacientes com dengue leve também apresentaram maiores frequências de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN $\gamma$ /TNF específicas ao ENV e ao NS3 comparado com pacientes com sa+/grave e indivíduos controle (Fig.11B e 11G). De modo importante, as frequências de células T CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> específicas ao ENV são maiores em dengue leve, durante a fase crítica e de convalescência, comparado com os grupos de pacientes sa+/grave e controle (Figs.11A - D). O mesmo encontramos com relação às frequências de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN $\gamma$ /IL10 específicas ao NS3 que estão aumentadas no grupo com dengue leve, na fase crítica, comparado com os grupos dengue sa+/grave e controle (Fig.11G). E ainda, as frequências de células T CD4<sup>+</sup> TNF<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> TNF<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> específicas tanto ao ENV e ao NS3 estão suprimidas em pacientes que apresentam sa+/grave dengue, durante o período de convalescência, comparado com o dengue leve e controle (Figs.11C, D, F e H).



**Figura 11. Frequência de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> duplo produtoras de IFN $\gamma$ /TNF ou IFN $\gamma$ /IL10 ou TNF/IL10.** PBMC de pacientes com dengue leve (quadrado verde) e sa+/grave (triângulo azul) foram estimuladas com bibliotecas de peptídeos para ENV (A-D) e NS3 (E-H), durante as fases críticas e de convalescência da infecção. As frequências de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> duplo produtoras de IFN $\gamma$ , TNF ou IL10 foram avaliadas por citometria de fluxo. As linhas vermelhas representam a GM. Linhas pontilhadas representam a GM do grupo de controle não infectado (N = 11-15). As diferenças entre os grupos de grupos infectados com DENV foram analisadas pelo teste estatístico de Mann-Whitney e são indicadas por asteriscos (\*) para P < 0,05. As comparações entre os grupos controle não-infectado e dengue foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis e são indicadas pelo sinal da cerquilha (#) para P < 0,05. Durante a fase crítica dengue leve n = 20-22, sa+/grave n = 14-16. Convalescência dengue leve n = 19-20, sa+/grave n = 4-5.

De um modo geral, observamos que no grupo de dengue leve há um aumento na frequência de células T triplo produtoras de IFN $\gamma$ /TNF/IL10 específicas para NS3, porém não para ENV. Por exemplo, durante a fase crítica, a frequência de células T CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$  IFN $\gamma^{+}$ TNF $^{+}$ IL10 $^{+}$  na presença de NS3 é maior em pacientes com dengue leve comparado ao grupo com dengue sa+/grave (Fig.12E), e ainda a frequência das células T CD8 $^{+}$  também triplo produtoras e específicas ao NS3 é maior em dengue leve tanto com relação à sa+/grave quanto ao controle (Fig.12G). De modo importante, notamos que o grupo com dengue leve, no período de convalescência, possui maior frequência de células T CD4 $^{+}$  e CD8 $^{+}$ , produtoras de IFN $\gamma$ /TNF/IL10 específico a NS3 quando comparado com sa+/grave e também ao controle (Fig.12F e G). De modo interessante, estes dados indicam que o NS3 parece ser um melhor estimulador das respostas multifuncionais em células T.

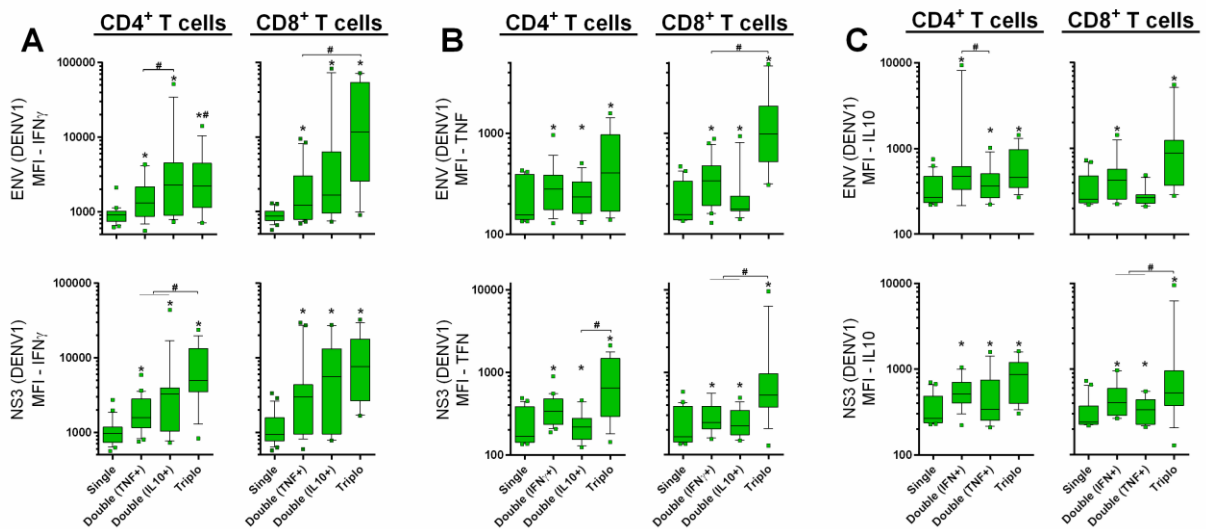


**Figura 12. Frequência de células T CD4 $^{+}$  ou CD8 $^{+}$  triplo produtoras de IFN $\gamma$ /TNF/IL10.** PBMC de pacientes com dengue leve (quadrado verde) e sa+/grave (triângulo azul) foram estimuladas com bibliotecas de peptídeos para ENV (A-D) e NS3 (E-H), durante as fases críticas e de convalescência da infecção. As frequências de células T CD4 $^{+}$  ou CD8 $^{+}$  triplo produtoras de IFN $\gamma$ , TNF ou IL10 foram avaliadas por citometria de fluxo. As linhas vermelhas representam a GM. Linhas pontilhadas representam a GM do grupo de controle não infectado (N = 11-15). As diferenças entre os grupos de grupos infectados com DENV foram analisadas pelo teste estatístico de Mann-Whitney e são indicadas por asteriscos (\*) para P < 0,05. As comparações entre os grupos controle não-infectado e dengue foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis e são indicadas pelo sinal da cerquilha (#) para P < 0,05. Durante a fase crítica dengue leve n= 20-22, sa+/grave n= 14-16. Convalescência dengue leve n= 19-20, sa+/grave n= 4-5.

*As células T multifuncionais produzem maiores quantidades de IFN $\gamma$ , TNF e IL10.*

Para comparar os níveis de citocinas encontradas nas células T simples, duplo ou triplo produtoras, verificamos o MFI de cada citocina  $IFN\gamma$ , TNF e IL10. Na maioria das vezes, encontramos que o MFI de cada uma das citocinas é maior nas células T triplo produtoras comparado com as células T duplo e simples produtoras (Fig.13). Por exemplo, o valor de MFI de  $IFN\gamma$  encontrado nas células T  $CD8^+ IFN\gamma^+TNF^+IL10^+$  específicas ao ENV foi de 9739, enquanto que as para as simples produtoras ( $IFN\gamma^+TNF^-IL10^-$ ) foi de 872,6, e para as duplo produtoras  $IFN\gamma^+TNF^+IL10^-$  e  $IFN\gamma^+TNF^-IL10^+$  foram respectivamente de 1629 e 2986 (Fig.13A). Resultados similares foram observados para células T produtoras de TNF e IL10 (Fig.13B e C, respectivamente), bem como para a produção de  $IFN\gamma$ , TNF e IL10 por células T específicas para NS3 (Fig.13A-C).

### Mild dengue - Critical phase



**Figura 13. MFI da produção de citocinas por células T  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  simples, duplo ou triplo produtoras de  $IFN\gamma$ , TNF e IL10 em pacientes com dengue leve durante a fase crítica.** PBMC de pacientes com dengue leve durante a fase crítica foram estimuladas com bibliotecas de peptídeos para ENV e NS3. MFI de  $IFN\gamma$  (A) por células T simples ( $IFN\gamma^+TNF^-IL10^-$ ), duplo ( $IFN\gamma^+TNF^+IL10^-$  e  $IFN\gamma^+TNF^-IL10^+$ ) e triplo ( $IFN\gamma^+TNF^+IL10^+$ ) produtoras. MFI de TNF (B) pelas simples ( $IFN\gamma^+TNF^+IL10^-$ ), duplo ( $IFN\gamma^+TNF^+IL10^-$  e  $IFN\gamma^+TNF^-IL10^+$ ) e triplo ( $IFN\gamma^+TNF^+IL10^+$ ) produtoras. MFI de IL10 (C) por simples ( $IFN\gamma^+TNF^-IL10^+$ ), duplo ( $IFN\gamma^+TNF^+IL10^+$  e  $IFN\gamma^+TNF^-IL10^+$ ) e triplo ( $IFN\gamma^+TNF^+IL10^+$ ) produtoras. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, indicado por asteriscos (\*) quando comparado as simples, duplo e triplos para  $P < 0,05$ . A análise incluiu apenas populações de células T produtoras de citocinas, para células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  simples produtoras  $n=21$  e 20, respectivamente, duplo produtoras, 21 e 20 ou 18 e 20, e para triplo produtores 13 e 10.



4.5 O aumento na frequência de células T duplo ou triplo produtoras está positivamente relacionado com maiores níveis sanguíneos de plaquetas

Para investigar se essas células T multifuncionais estão associadas a parâmetros de evolução clínica, verificamos a correlação entre as frequências das populações de células T e a plaquetopenia avaliada durante a fase crítica. As medidas séricas de plaquetas durante a fase crítica estavam disponíveis para a maioria dos pacientes internados, mas conseguimos de poucos pacientes ambulatoriais. Mesmo assim, com estes dados disponíveis, observamos que durante a fase crítica há uma correlação positiva entre o nível de plaquetas e as frequências de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN $\gamma$ /TNF específicas ao ENV, entre as frequências de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN $\gamma$ /IL10 ou de IFN $\gamma$ /TNF específicas ao NS3, e também entre as frequências de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> triplo produtoras específicas ao DENV (Tabela 11), sugerindo um papel dessas populações celulares na evolução clínica.

**Tabela 10:** Correlação entre o volume plaquetário e a frequência de células T produtoras de citocinas específicas ao DENV

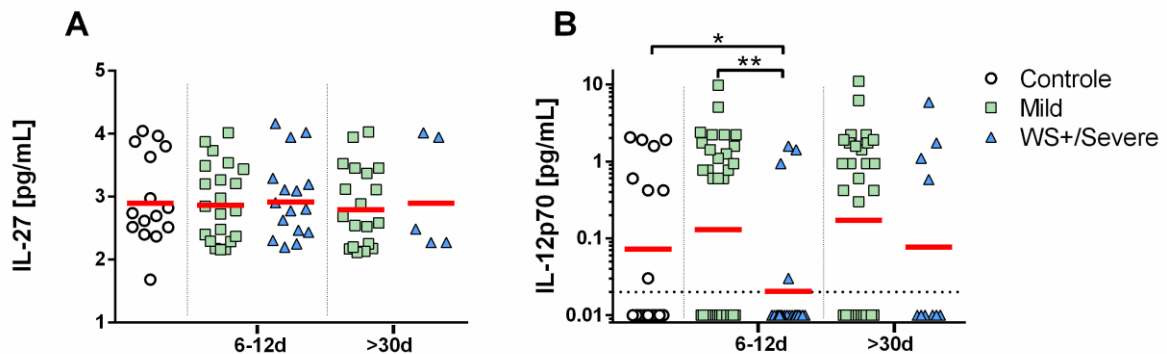
Produção de citocinas	Spearman rank r (P)			
	<i>Específico ao ENV</i>		<i>Específico ao NS3</i>	
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
<b>IFN<math>\gamma</math>+TNF-IL10<sup>-</sup></b>	Ns	ns	ns	ns
IFN $\gamma$ TNF+IL10 <sup>-</sup>	ns	ns	ns	ns
<b>IFN<math>\gamma</math>-TNF-IL10<sup>+</sup></b>	ns	ns	ns	ns
<b>IFN<math>\gamma</math>+TNF-IL10<sup>+</sup></b>	ns	ns	ns	0.51 (0.037)
<b>IFN<math>\gamma</math>+TNF+IL10<sup>-</sup></b>	ns	0.62 (0.005)	ns	0.58 (0.010)
IFN $\gamma$ TNF+IL10 <sup>+</sup>	ns	ns	ns	ns
<b>IFN<math>\gamma</math>+TNF+IL10<sup>+</sup></b>	0.47 (0.038)	0.50 (0.029)	0.71 (0.001)	0.53 (0.018)

ns – not significant

4.6 A diferença na IL12, mas não na IL27, está associada à presença de células T multifuncionais produtoras de IL10 em dengue leve

A IL27 tem sido associada à produção de IL10 pelas células Th1 na leishmaniose e na malária (LUCAS *et al.*, 2003; TIAN *et al.*, 2019). Foi demonstrado que IL27 coopera com IL12 para o surgimento (HEINEMANN *et al.*, 2014; LUCAS *et al.*, 2003) e função (WEI *et al.*, 2011)

de células Th1 que produzem IL10. A fim saber o mecanismo pelo qual induziu a produção de IL10 pelas células T duplo e triplo produtoras, avaliamos os níveis plasmáticos das citocinas IL27 e IL12p70. Não encontramos diferenças nos níveis plasmáticos de IL27 entre os grupos controle e as diferentes classificações da dengue, tanto durante a fase crítica quanto na convalescência (Fig.14A). Por outro lado, podemos observar que pacientes com dengue sa+/grave apresentam níveis suprimidos de IL12p70 durante a fase crítica quando comparado com dengue leve e indivíduos controle (Fig.14B). Esses dados sugerem que a IL12, mas não a IL27, está associado a presença de células produtoras de IFN $\gamma$  e IL10 pelas células T de pacientes com dengue leve.



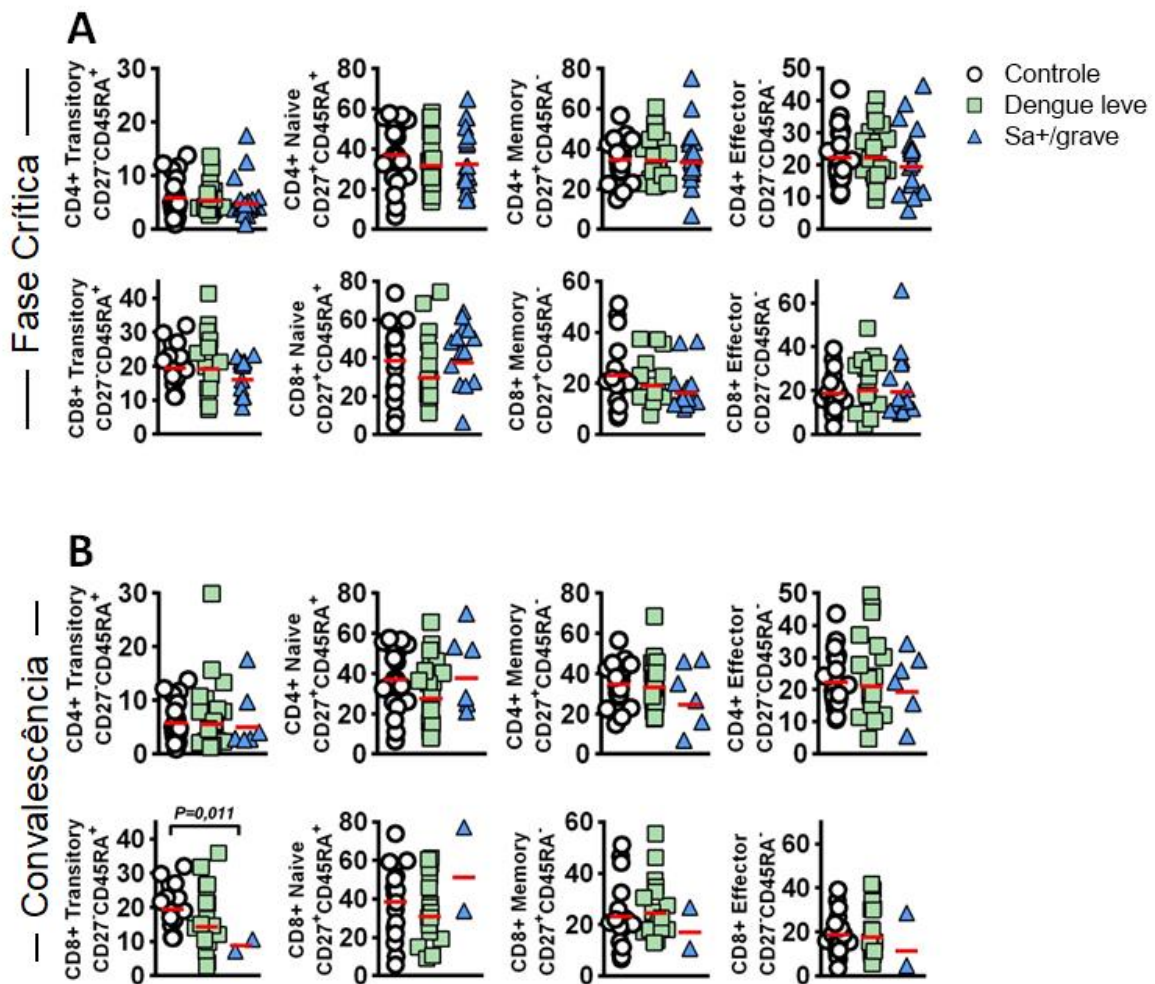
**Fig. 14. Níveis plasmáticos de IL27 e IL12p70.** (A) IL27 e (B) IL12p70 foram medidas em plasmas de pacientes infectados com dengue durante as fases crítica e de convalescência da infecção. Cada símbolo representa um único indivíduo, as linhas vermelhas representam a GM. A diferença entre os grupos dengue leve e sa+/grave no mesmo tempo foi analisada pelo teste estatístico de Mann-Whitney ( $P < 0.005$ ) e as diferenças entre os pacientes com o grupo controle pelo teste de Kruskal-Wallis. N foi, respectivamente, para IL27 e IL12p70, 15 e 17 para controles, 33 e 35 para dengue leve e 22 para sa+/grave durante a fase crítica. Durante a convalescência, o N foi 31 e 32 para dengue leve, e 5 e 10 para sa+/grave dengue.

#### 4.7 Subpopulações das células T e expressão de moléculas reguladoras nas células T<sub>eff</sub>

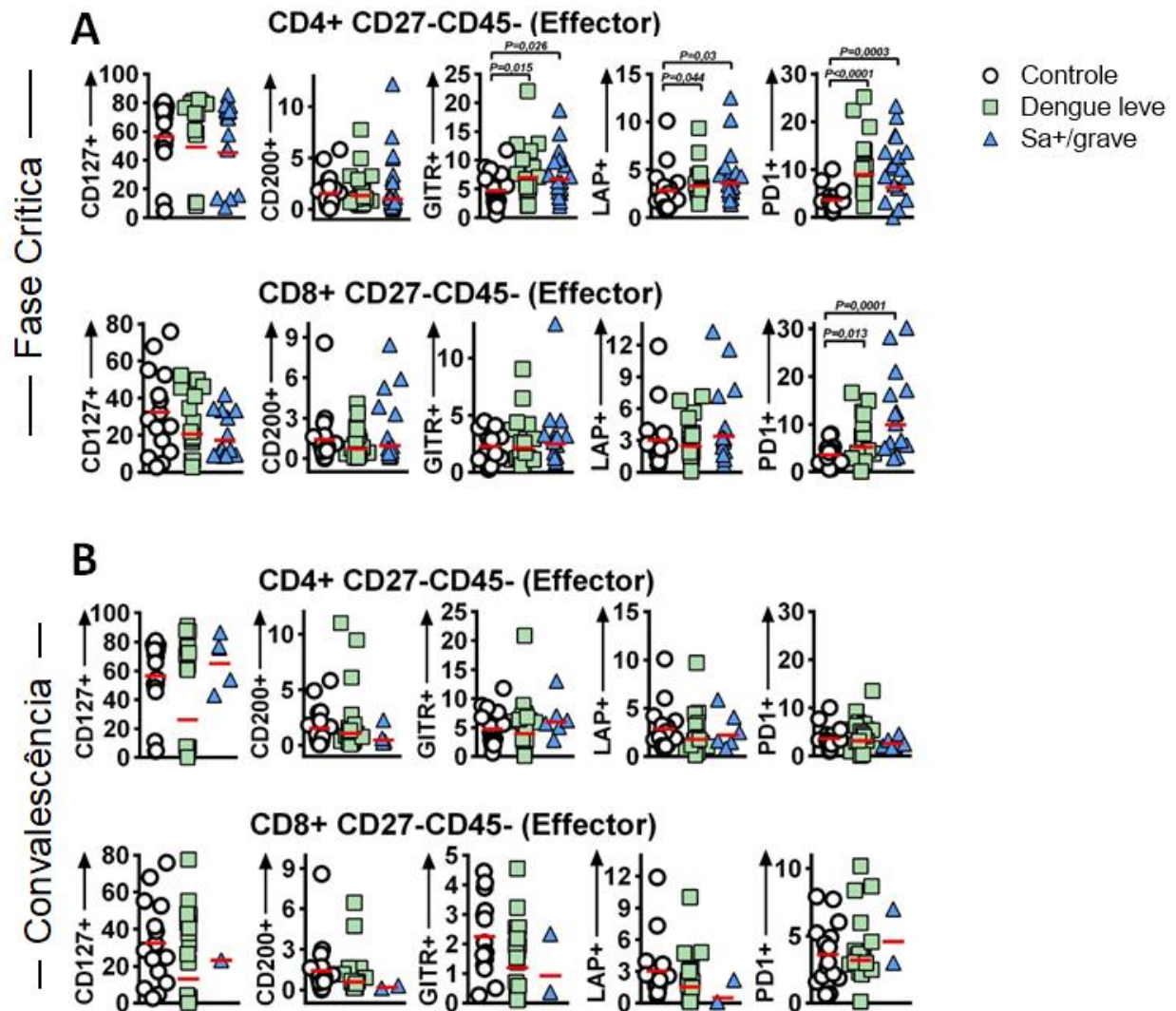
A fim de identificar quais os subtipos de linfócitos T estão respondendo a infecção por dengue, nós analisamos primeiramente a frequência das subpopulações de células T de memória ( $CD27^+CD45RA^-$ ), naïve ( $CD27^+CD45RA^+$ ), efetora transitória ( $CD27^-CD45RA^+$ ) e efetora ( $CD27^-CD45RA^-$ ) (Fig. 7 – dot plot representativo em materiais e métodos). Ao verificar a frequência das subpopulações de células T, CD4 e CD8, não encontramos diferenças relevantes entre os grupos controle e as diferentes classificações da dengue durante o período de defervescência ou convalescência (Fig. 15A e B).

A presença de moléculas reguladoras como CD127, CD200, GITR, LAP e PD1, também foi avaliada nesses subtipos de linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ . Nós encontramos, que embora a infecção

por dengue tenha aumentado a presença das moléculas reguladoras (GITR, LAP e PD1) nas células T CD4<sup>+</sup> efectoras, sua expressão foi similar nas diferentes apresentações da dengue durante a fase crítica (Fig. 16A). Observamos que a expressão de receptores reguladores (GITR, LAP e PD1) retornam aos níveis basais nas células T efectoras dos pacientes com dengue na fase de convalescência (Fig. 16B). Não houve diferença na expressão destas moléculas reguladoras analisadas nos demais subtipos, memória (CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), naïve (CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) e efectora transitória (CD27<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>). Esses dados nos sugerem que os linfócitos T de pacientes com dengue leve e sa+/grave apresentam capacidade de autoregulação semelhantes.



**Figura 15** – Frequências das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. PBMCs provenientes de indivíduos controle e pacientes com dengue leve e sa+/grave nas fases críticas (A) e convalescência (B) foram descongeladas e marcadas com painel de anticorpos para identificação das subpopulações de linfócitos T, conforme descrito em material e métodos. Em A e em B estão representadas a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> vivas (ViViD<sup>-</sup>) dentro do gate de células CD3<sup>+</sup>. Para subpopulações de CD4<sup>+</sup> Controle n=16; durante a fase crítica dengue leve n=17 e sa+/grave n=17; durante a convalescência dengue leve n=18 e sa+/grave n=6. Para subpopulações de CD8<sup>+</sup> Controle n=13, fase crítica dengue leve n=16 e sa+/grave n=13; convalescência dengue leve n=16 e sa+/grave n=2. Linha vermelha representa a GM. Teste estatístico Mann-Whitney.



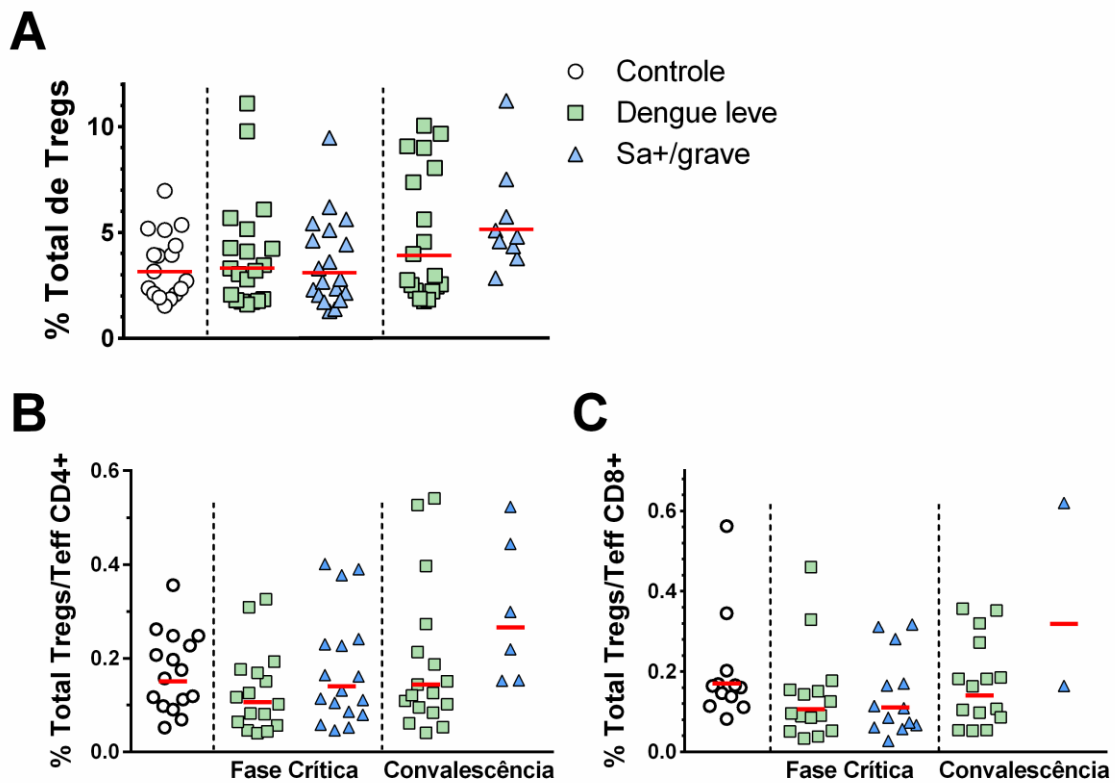
**Figura 16 – Expressão de CD127, CD200, GITR, LAP e PD1 por células Teff CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** PBMCs provenientes de indivíduos controle e pacientes com dengue leve e sa+/grave nas fases críticas (A) e convalescência (B) foram descongeladas e marcadas com painel de anticorpos para identificação das subpopulações de linfócitos T, conforme descrito em material e métodos. Em A e em B estão representadas a percentagem de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> expressando as moléculas reguladoras CD127, CD200, GITR, LAP e PD1. Para CD4<sup>+</sup> Effector controle n=17, durante a fase crítica dengue leve n=16 e sa+/grave n=17; convalescência dengue leve n=16 e sa+/grave n=5. CD8<sup>+</sup> Effector controle n=14, durante a fase crítica dengue leve n=14 e sa+/grave n=13; convalescência dengue leve n=15 e sa+/grave n=2. Linha vermelha representa a GM. Teste estatístico Mann-Whitney.

#### 4.8 A frequência de células Tregs é similar entre as diferentes classificações da dengue

As células T reguladoras (Tregs) desempenham importante função no controle das respostas imunes e prevenção de possíveis danos causados pela inflamação, como já foi demonstrado em infecções como HSV e WNV (LANTERI *et al.*, 2009; SARANGI *et al.*, 2008; SEHRAWAT *et al.*, 2008; SUVAS *et al.*, 2004). Como dito anteriormente, a dengue induz um processo inflamatório bem elucidado e que pode culminar em uma imunopatologia, portanto é

importante analisar o perfil de células Tregs (Fig. 8 – estratégia de análise em materiais e métodos) durante a infecção por dengue. Ao avaliarmos a frequência total das Tregs circulantes, observamos que foi similar entre os grupos controle e os grupos de pacientes com dengue durante a fase crítica e de convalescência (Fig. 17A).

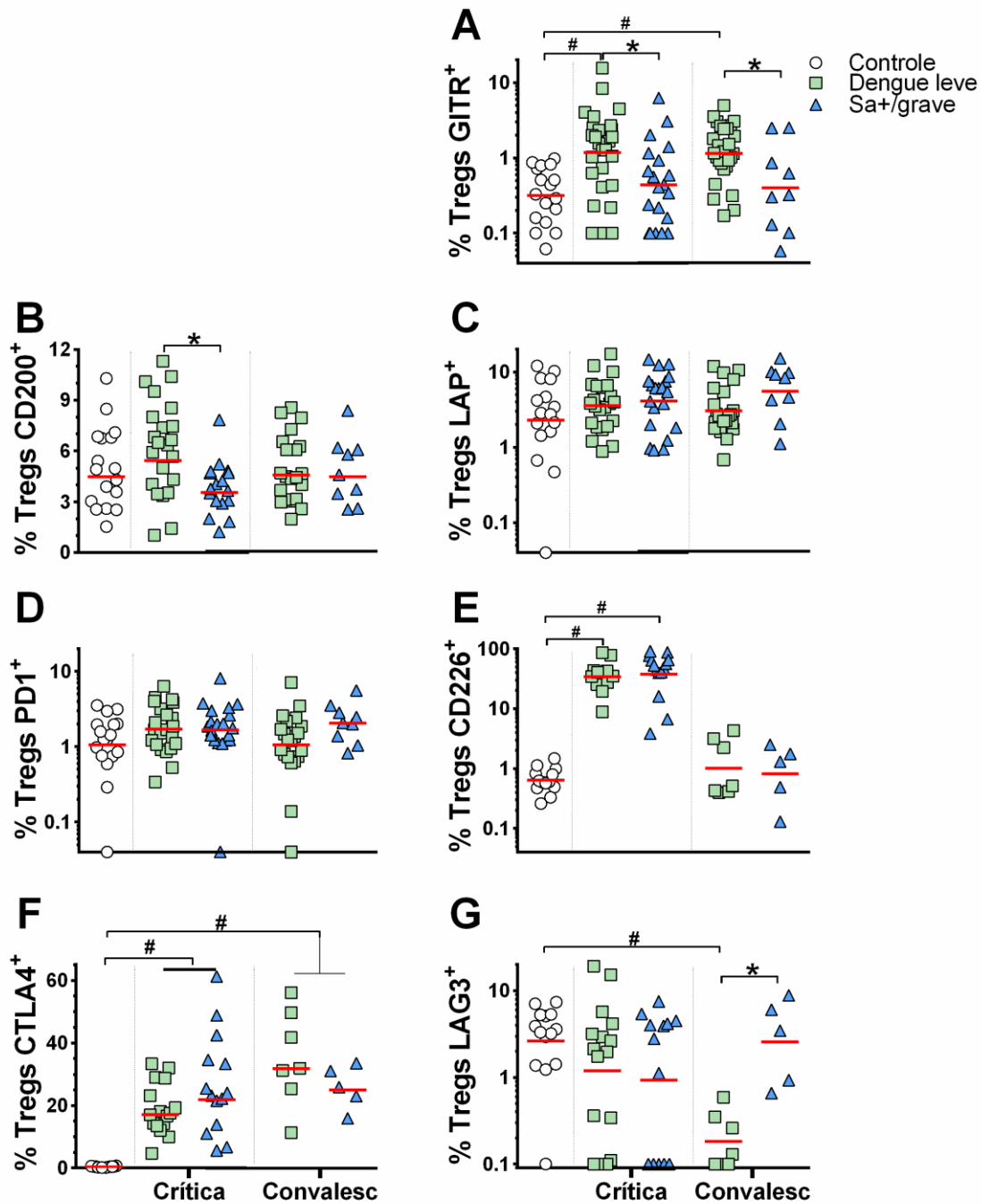
Até o momento poucos trabalhos avaliaram as células Tregs em pacientes com dengue. No estudo de (LUHN *et al.*, 2007), assim como no nosso, não foi encontrado diferenças na frequência total de tregs entre as classificações clínicas da dengue. Eles também avaliaram a razão de Tregs por Teff e encontraram que apenas o grupo dengue leve apresentou um aumento de Tregs sobre Teff. Em nosso trabalho ao analisarmos a razão entre Tregs/Teff não observamos o mesmo que o grupo de (LUHN *et al.*, 2007), ou seja, não encontramos diferenças entre os grupos quando avaliamos a frequência de Tregs/CD4<sup>+</sup> Teff (Fig. 17B e C).



**Figura 17 – Frequência Total de Tregs e Razão entre a frequência de Tregs/Teff.** PBMCs provenientes de indivíduos controle e pacientes com dengue leve e sa+/grave nas fases críticas e de convalescência foram descongeladas e marcadas para identificação de Tregs e linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> efetores, conforme descrito em material e métodos. Em A está representado a frequência total de células Tregs. Em B e C estão as razões entre a frequência total de células Tregs e as frequências de CD4<sup>+</sup> Teff ou CD8<sup>+</sup> Teff, respectivamente. (A) Controle n=17, durante a fase crítica dengue leve n=20 e sa+/grave n=19, convalescência dengue leve n=19 e sa+/grave n=9. (B) controle = 16, durante a fase crítica dengue leve n=16 e sa+/grave n=17, convalescência dengue leve n=17 e sa+/grave n=6. (C) Controle = 13, durante a fase crítica dengue leve n=15 e sa+/grave n=13, convalescência dengue leve n=15 e sa+/grave n=2. As linhas vermelhas representam a GM. Teste estatístico Mann-Whitney.

4.9 De um modo geral as células Tregs GITR<sup>+</sup> ou CD200<sup>+</sup> ou LAG3<sup>+</sup> parecem ser importantes para determinar a evolução clínica da doença em pacientes com dengue

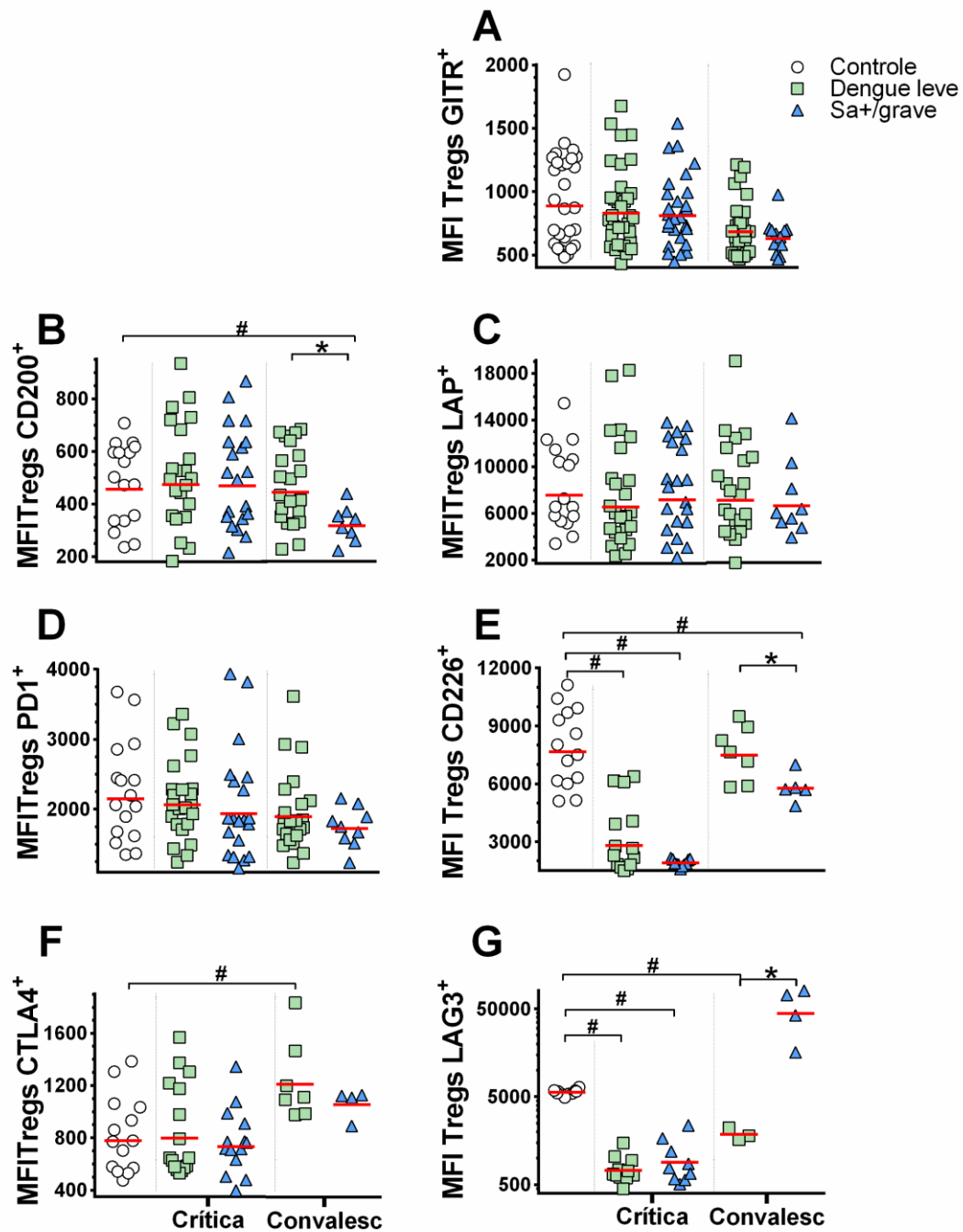
Além de verificar a presença destas Tregs em pacientes com dengue, é importante avaliar o fenótipo destas células. Verificamos o fenótipo das Tregs em diferentes formas clínicas de dengue por meio da expressão de moléculas reguladoras, como por exemplo GITR, CD200, LAP, PD1, CD226, CTLA4 e LAG3. Notavelmente a frequência de células Tregs expressando GITR é significativamente maior em dengue leve comparado com os grupos controle e dengue sa+/grave, tanto durante a fase crítica e na convalescência (Fig. 18A). No período crítico, encontramos um aumento na frequência de Tregs CD200<sup>+</sup> em dengue leve quando comparado com dengue sa+/grave (Fig.18B). Em relação a frequência de Tregs que expressam LAP ou PD1, não encontramos diferenças entre o controle e pacientes com dengue tanto durante o período crítico e quanto na convalescência (Figs.18C e D). A frequência de Tregs CD226<sup>+</sup> é maior em pacientes com dengue durante o período crítico quando comparado com o controle (Fig.18E), e na convalescência retornam aos níveis basais. A infecção pelo DENV induziu ainda maior frequência de Tregs expressando CTLA4 observado tanto na fase crítica quanto na convalescência (Fig. 18F). Observamos também que a frequência de Tregs que expressam LAG3 está diminuída em dengue leve apenas na convalescência quando comparado com os grupos controle e dengue sa+/grave (Fig.18G).



**Figura 18 – Frequência de Tregs expressando GITR, CD200, LAP, PD1, CTLA4, LAG3 e CD226.** Após descongelamento, PBMCs provenientes de indivíduos Controle, pacientes dengue leve e sa+/grave nas fases crítica e de convalescência foram submetidas a marcação com painel de anticorpos para avaliar a expressão de GITR, CD200, LAP, PD1, CD226, CTLA4 e LAG3 por Tregs como detalhado em Material e Métodos. Controle n=xx, dengue leve n=xx e sa+/grave n=xx. As linhas vermelhas representam a GM. As diferenças entre os grupos de grupos infectados com DENV foram analisadas pelo teste estatístico de Mann-Whitney e são indicadas por asteriscos (\*) para  $P < 0,05$ . As comparações entre os grupos controle não-infectado e dengue foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis e são indicadas pelo sinal da cerquilha (#) para  $P < 0,05$ . (A-D) controle n= 16-17; fase crítica dengue leve n= 22-28 e sa+/grave n= 17-20; convalescência dengue leve n= 21-27 e sa+/grave n= 9. (E-G) controle n= 10-14; fase crítica dengue leve n= 11-16 e sa+/grave n= 13-14; convalescência dengue leve n= 7 e sa+/grave n= 5.

Verificamos também o nível de expressão dessas moléculas reguladoras analisando o MFI. Apesar das diferenças nas frequências de Tregs GITR<sup>+</sup>, não observamos diferença entre grupos com relação ao MFI de GITR nas Tregs de controle e pacientes com dengue (Fig.19A). De forma semelhante, a densidade da expressão celular de LAP e PD1 também não apresentaram diferenças entre as formas clínicas de dengue (Fig.19C e D). Por outro lado, encontramos que o MFI de CD200 nas células Tregs provenientes de indivíduos com dengue leve é maior comparado com indivíduos com dengue sa+/grave apenas fase convalescente, quando o grupo com dengue sa+/grave parece sofrer uma supressão dos seus níveis (Fig.19B). Curiosamente, apesar da frequência de Tregs CD226<sup>+</sup> estar aumentada em pacientes com dengue durante a fase crítica, a densidade de CD226 na superfície das Tregs diminuiu nos pacientes na fase crítica quando comparado com o grupo controle (Fig.19E) apresentando um movimento de retorno aos níveis basais primeiramente no grupo com dengue leve seguido do grupo com dengue sa+/grave na convalescência (Fig. 19E). Além dos pacientes com dengue apresentarem maior frequência de Tregs CTLA4<sup>+</sup> em relação ao grupo controle, tanto na fase crítica quanto na convalescência, observamos também um aumento do MFI para CTLA4 nas Tregs de pacientes com dengue durante a fase de convalescência (Fig. 19F). A expressão celular de LAG3 das Tregs de pacientes com dengue na fase crítica é menor quando comparada com a do grupo controle (Fig. 19G), retornando aos níveis basais ou até mesmo maiores, caso do grupo com dengue sa+/grave, no período de convalescência (Fig. 19G).

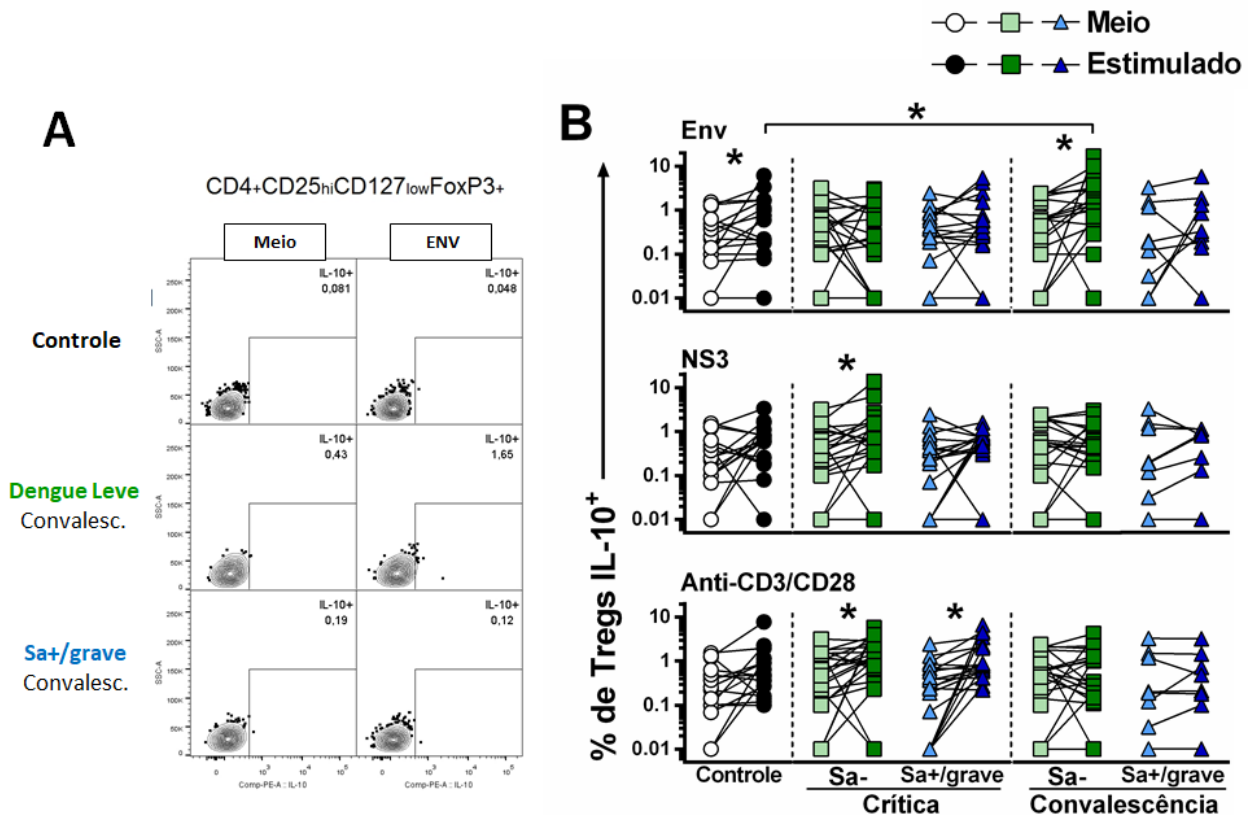




**Figura 19 – MFI de GITR, CD200, LAP, PD1, CTLA4, LAG3 e CD226 expressas em células Tregs.** Após descongelamento, PBMCs provenientes de indivíduos Controle, pacientes dengue leve e sa+/grave nas fases crítica e de convalescência foram submetidas a marcação com painel de anticorpos para avaliar o MFI de GITR, CD200, LAP, PD1, CD226, CTLA4 e LAG3 por Tregs como detalhado em Material e Métodos. As linhas vermelhas representam a GM. As diferenças entre os grupos de grupos infectados com DENV foram analisadas pelo teste estatístico de Mann-Whitney e são indicadas por asteriscos (\*) para  $P < 0,05$ . As comparações entre os grupos controle não-infectado e dengue foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis e são indicadas pelo sinal da cerquilha (#) para  $P < 0,05$ . (A-D) controle  $n = 16-17$ ; fase crítica dengue leve  $n = 22-28$  e sa+/grave  $n = 17-20$ ; convalescência dengue leve  $n = 21-27$  e sa+/grave  $n = 9$ . (E-G) controle  $n = 10-14$ ; fase crítica dengue leve  $n = 11-16$  e sa+/grave  $n = 13-14$ ; convalescência dengue leve  $n = 7$  e sa+/grave  $n = 5$ .

#### 4.10 Paciente com dengue leve possuem população de Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV1

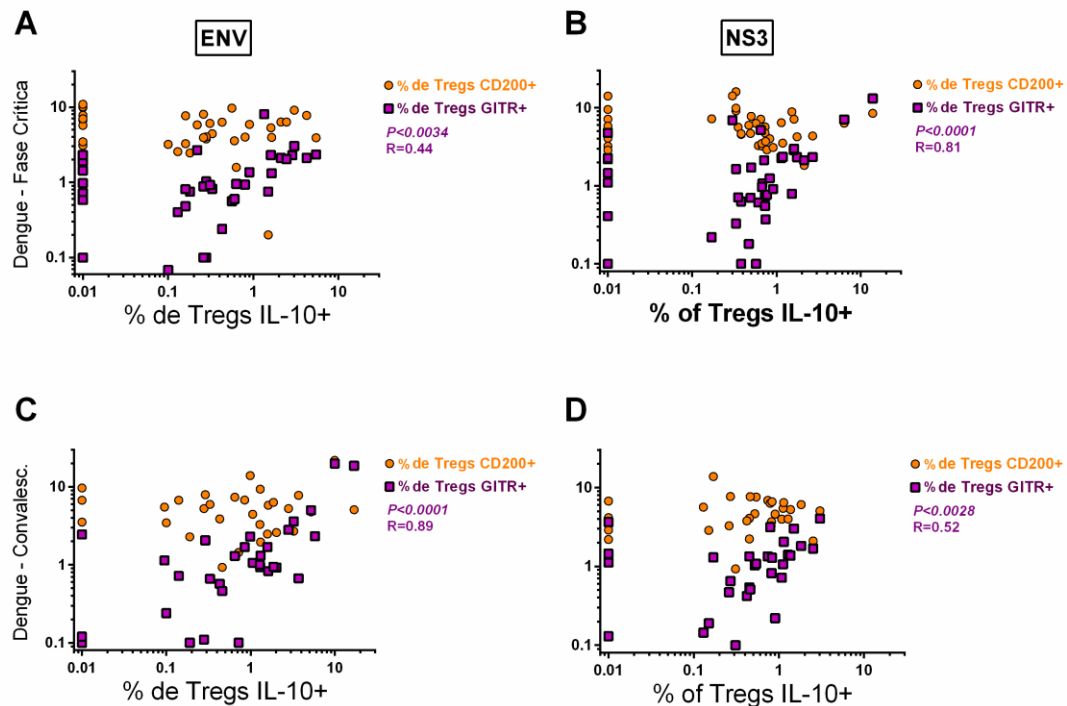
As Tregs, além de utilizar moléculas reguladoras como forma de inibir a função de outras células, também produzem citocinas anti-inflamatórias como IL10. Portanto verificamos a produção de IL10 pelas Tregs quando estimuladas com as bibliotecas de peptídeos de ENV e NS3 de DENV1. De modo importante, encontramos um aumento significativo na frequência de Tregs produtoras de IL10 específicas ao NS3 de DENV1 em indivíduos com dengue leve durante a fase crítica. E ainda, também houve aumento significativo na frequência de Tregs produtoras de IL10 específicas ao ENV de DENV1 em indivíduos com dengue leve durante a convalescência (Fig. 20B). De forma curiosa, o grupo controle também respondeu ao estímulo com ENV (Fig. 20B).



**Figura 20 – Frequência de células Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV1.** Após descongelamento, PBMCs provenientes de indivíduos controle dengue leve e sa+/grave nas fases críticas e de convalescência foram cultivadas por 10 horas na ausência ou na presença de estímulos imunogênicos (ENV ou NS3 - DENV1) ou policlonal (Anti-CD3 e Anti-CD28). Em todas as condições foi adicionado BFA. Após o término da incubação, as células foram marcadas para avaliar a produção de IL10 por Tregs como detalhado em Material e Métodos. (A) Dot plot representativo da produção de IL10 por Tregs na ausência ou presença de estímulo da biblioteca de ENV DENV1 do grupo Controle, dengue leve e sa+/grave. (B) Frequência de Tregs produzindo IL10 na presença da biblioteca de peptídeos ENV ou NS3 de DENV1 ou na presença de aCD3/aCD28, Controle n=17, 6-12d dengue leve n=23 e sa+/grave n=19, >30d dengue leve n=22 e sa+/grave n=9. Teste estatístico Wilcoxon e Mann-Whitney.

#### 4.11 As células Tregs produtoras de IL10 específica ao DENV expressam GITR, mas não CD200

Como as Tregs de indivíduos com dengue leve têm maior expressão de CD200 e GITR quando comparados a pacientes com dengue sa+/grave, resolvemos verificar se tais moléculas poderiam ser marcadores extracelulares das Tregs IL10<sup>+</sup>. Assim, realizamos um estudo de correlação entre as Tregs específicas ao DENV1 provenientes dos pacientes com dengue durante as fases críticas e de convalescência. Não observamos correlação entre as Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV e expressando CD200 (Fig.21A-D). De modo importante, houve uma forte correlação entre as Tregs produtoras de IL10 estimuladas com a biblioteca de ENV (Fig.21A e C) ou NS3 (Fig.21B e D) de DENV1 e as Tregs GITR<sup>+</sup> provenientes de pacientes com dengue durante as fases crítica e de convalescência.



**Figura 21 – Correlação de Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV1 e Tregs GITR<sup>+</sup> ou CD200<sup>+</sup>.** Após descongelamento, PBMCs provenientes de pacientes com dengue nas fases críticas e de convalescência foram cultivadas por 10 horas na ausência ou na presença da biblioteca de peptídeos de ENV ou NS3 de DENV1. Em todas as condições foi adicionado a BFA. Após o término da incubação, as células foram submetidas a marcação para avaliar a produção de IL10 e expressão de CD200 e GITR por Tregs como detalhado em Material e Métodos. Correlação entre Tregs produtoras de IL10 específicas ao ENV de DENV1 expressando CD200 ou GITR de pacientes com dengue na fase crítica (A) ou de convalescência (C). Correlação entre Tregs produtoras de IL10 específicas ao NS3 de DENV1 expressando CD200 ou GITR de pacientes com dengue na fase crítica (B) ou de convalescência (D). Pacientes com dengue na fase crítica n=41 e na convalescência n= 31. Teste estatístico Pearson correlation coefficients (P value: two-tailed).

As células Tregs GITR<sup>+</sup> são as que produzem IL10 específico ao DENV em pacientes com dengue, verificamos então se estas Tregs GITR<sup>+</sup> também expressam CD200, LAP, PD1, CD226, CTLA4 ou LAG3. Observamos que há uma correlação positiva entre as Tregs GITR<sup>+</sup> e as Tregs LAP<sup>+</sup> ou CD226<sup>+</sup> durante a fase crítica da dengue (Tabela 11). E ainda, as Tregs GITR<sup>+</sup> de pacientes com dengue também expressam LAG3 durante a convalescência (Tabela 11). Estes marcadores adicionais podem contribuir para selecionar as Tregs específicas ao DENV e produtoras de IL10.

**Tabela 11** – Correlação entre as células Tregs GITR<sup>+</sup> específicas ao ENV de DENV e as células Tregs expressando CD200, LAP, PD1, CD226, CTLA4 ou LAG3.

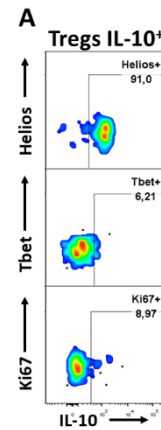
		Pearson rank r (P)					
		<b>Tregs expressando:</b>					
		<b>CD200</b>	<b>LAP</b>	<b>PD1</b>	<b>CD226</b>	<b>CTLA4</b>	<b>LAG3</b>
Fase Crítica	<b>Tregs GITR<sup>+</sup></b>	ns	0.37 (0.012)	ns	0.53 (0.006)	ns	ns
Convalescência	<b>Tregs GITR<sup>+</sup></b>	ns	ns	ns	ns	ns	0.76 (0.004)

ns - não significante

#### 4.12 As células Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV expressam marcador Helios, marcador de tTregs

Com o objetivo de compreender melhor a origem e características funcionais das Tregs IL10<sup>+</sup> específicas ao ENV de dengue, investigamos se são Tregs tímicas (tTregs) através da expressão do fator de transcrição Helios. Se possuem uma resposta reguladora direcionada as respostas inflamatórias de perfil Th1 por meio da expressão de Tbet. Por fim, verificamos se estão proliferando, medido pela expressão de Ki67. Observamos que mais de 90% das Tregs produtoras de IL10 específicas ao ENV de DENV expressaram Helios (Fig. 22), enquanto que menos de 7% e 9% das Tregs IL10<sup>+</sup> específicas ao ENV de DENV expressam Tbet e Ki67, respectivamente (Fig. 22). Estes dados ainda que preliminares sugerem que estas células são tTregs produtoras de IL10 específicas ao ENV de DENV que não possuem um controle direcionado ao perfil pró-inflamatório do tipo Th1 e não estão proliferando.

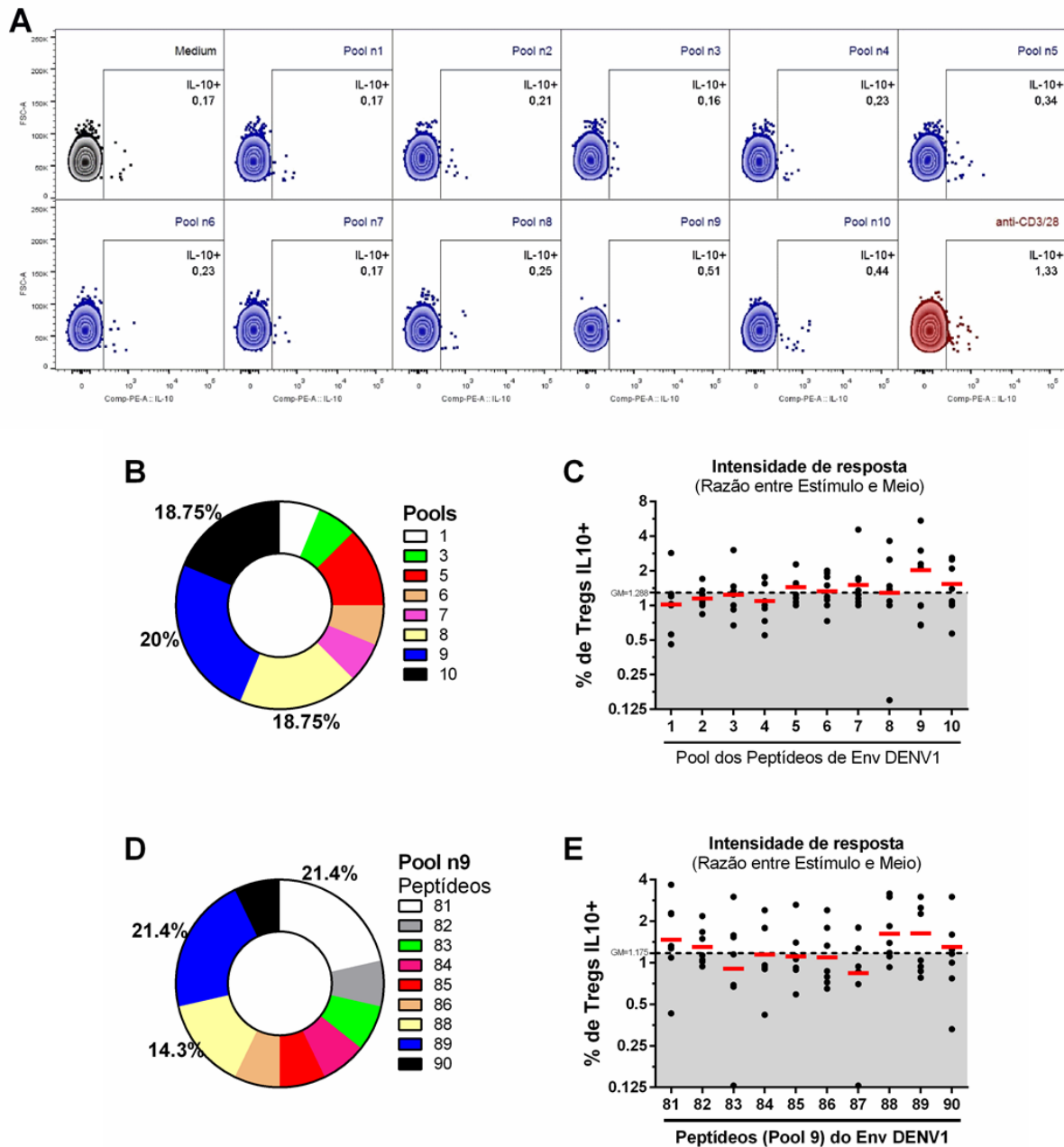
**Figura 22 – Expressão de Helios, Tbet ou Ki67 pelas Tregs produtoras de IL10 específicas ao ENV de DENV1.** Dot plot representativo de paciente com dengue leve na fase de convalescência de Tregs produtoras de IL10 específicas ao ENV de DENV1 expressando Helios ou Tbet ou Ki67.



#### 4.13 Mapeamento de epítipo das Tregs produtoras de IL10 específicas ao ENV de DENV1

A fim de identificar o epítipo ou epítipos responsáveis pela ativação das Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV, iniciamos o mapeamento de epítipo utilizando a biblioteca de peptídeos de ENV de DENV1. Para isso, as PBMCs de voluntários que possuem Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV1, foram cultivadas por 10hs na presença de 10 pools dos peptídeos que cobrem toda a proteína do ENV de DENV1. Para investigar a indução da produção de IL10 pelas Tregs consideramos que houve resposta quando a produção de IL10 na presença dos pools de peptídeos de ENV foi maior que o dobro quando comparado com os níveis basais. Encontramos que os peptídeos presentes nos pools 8, 9 e 10 parecem ter sido os mais importantes na indução da produção de IL10 pelas Tregs específicas ao DENV (Fig.23A e B). Com destaque para o pool 9 que foi responsável por 20% do total de Tregs produtoras de IL10 apresentadas (Fig.23B) e que apresentou a resposta de maior magnitude, ou seja, a produção de IL10 pelas Tregs específicas ao DENV na presença dos peptídeos do pool 9 foi maior que o limiar de intensidade de resposta observado nos demais pools (Fig.18C). Além disso, 6 de 8 indivíduos testados responderam ao pool 9 com produção de IL10 pelas Tregs.

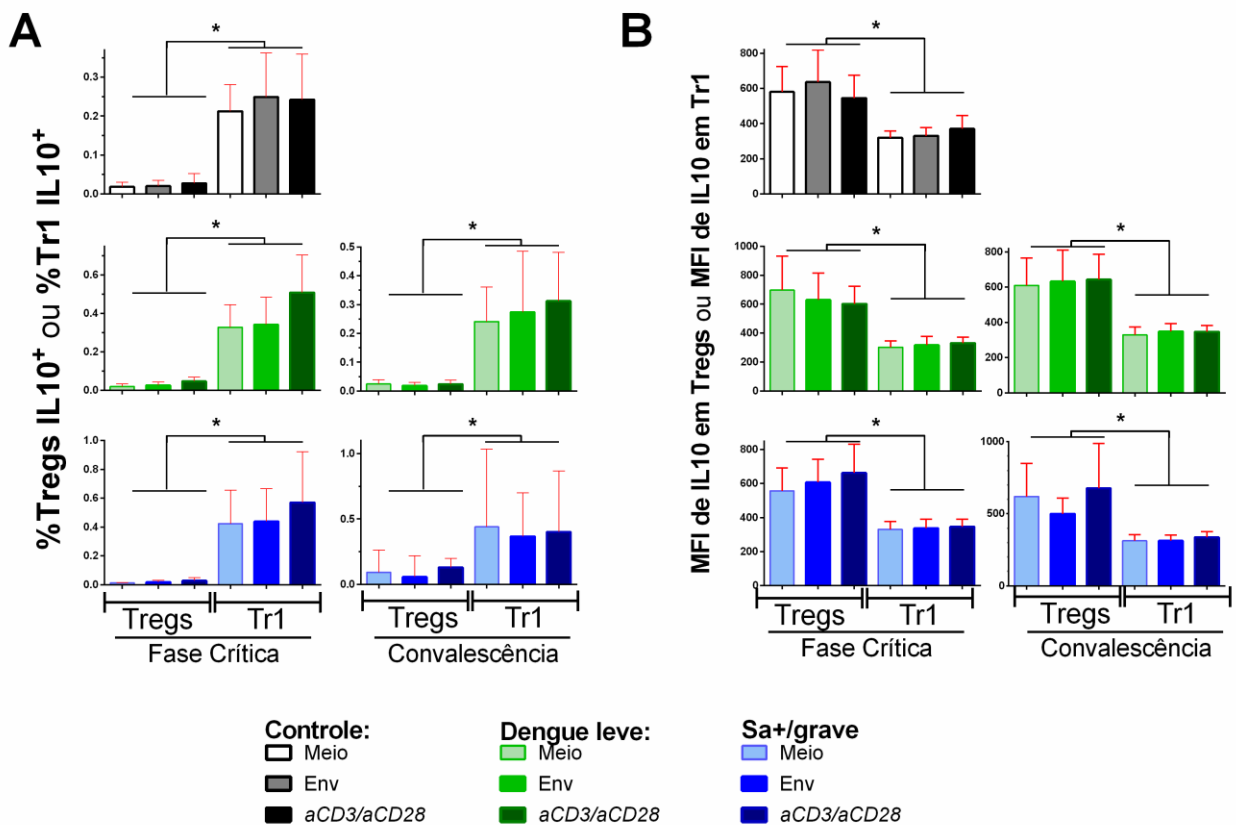
Para verificar quais dos peptídeos que estavam no pool 9 induziram a produção de IL10 pelas Tregs específicas ao DENV, as PBMCs de voluntários que possuem Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV1, foram cultivadas por 10hs na presença individual dos peptídeos que constituíam o pool 9 (peptídeos de 81 a 90). Podemos observar que os peptídeos 81, 88 e 89 foram os que induziram maior resposta entre os voluntários, visto que suas Tregs específicas ao DENV estimuladas com os peptídeos 81, 88 e 89 produziram IL10 maior que o dobro quando comparado com os níveis basais (Fig.23C). Destacamos de forma importante, os peptídeos 88 e 89 que induziram uma resposta de maior magnitude comparado com os demais peptídeos (Fig.23D).



**Figura 23** – Mapeamento de epítipo da proteína ENV de DENV1 utilizando Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV. Após descongelamento PBMCs foram cultivadas por 10 horas na ausência (A-E), ou na presença de 10 pools da biblioteca de peptídeos de ENV DENV1 (A-C), ou na presença de peptídeos que constituíam o pool 9 (81-90 separadamente) (D e E), ou na presença de estímulo policlonal (anti-CD3 e anti-CD28). Em todas as condições foi adicionado BFA. Após o término da incubação, as células foram submetidas a marcação com painel de anticorpos para avaliar a produção de IL10 por Tregs como detalhado em Material e Métodos. (A) *Gates* representativas da produção de IL10 por Tregs específicas ao DENV1 na ausência ou presença de estímulo imunogênico ou policlonal. Distribuição das frequências de respostas de células Tregs produtoras de IL10 associadas aos pools de peptídeos de 1 a 10 (B) ou aos peptídeos 81 a 90 (D). Razão de resposta da produção de IL10 por Tregs específicas ao DENV1 entre as estimuladas com os pools de peptídeos (C) ou com os peptídeos separadamente (E) e a produção basal (ausência de estímulo). Linha tracejada representa a GM da produção de IL10 específica pelas Tregs de todos os voluntários (limiar da intensidade de resposta), para (C) GM = 1.288 e (E) GM=1.175. As linhas vermelhas representam a GM. (B) e (C) n=8. (D) e (E) n=7.

#### 4.14 Células Tregs são maiores produtoras de IL10 que as células Tr1

Além das células Tregs, outra fonte produtora da citocina anti-inflamatória IL10 são células T CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>-</sup> (Tr1 – T reguladoras do tipo 1). Neste trabalho para estudarmos as células Tr1 excluimos da população de células T CD4<sup>+</sup> as células CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>, como melhor detalhado em métodos. Comparamos a frequência de células Tregs IL10<sup>+</sup> com as células Tr1 para avaliar a contribuição destas populações na produção de IL10 durante a infecção por dengue. Observamos que dentre as células T CD4 total a produção de IL10 é mais frequente em Tr1 quando comparado com as Tregs (Fig.24A). No entanto, de modo importante encontramos que o nível de produção de IL10 é maior em Tregs quando comparado com as Tr1 (Fig.24B).



**Figura 24 – Comparação da produção de IL10 pelas células Tregs e por células Tr1.** Após descongelamento PBMCs de controles, dengue leve e sa+/grave, foram cultivadas por 10 horas na ausência, ou na presença da biblioteca de peptídeos de ENV DENV1 e na presença de estímulo policlonal (anti-CD3 e anti-CD28). Em todas as condições foi adicionado BFA. Após o término da incubação, as células foram submetidas a marcação com painel de anticorpos para avaliar a produção de IL10 por Tregs e por Tr1 como detalhado em Material e Métodos. (A) Frequência de Tregs IL10<sup>+</sup> e Tr1 IL10<sup>+</sup> dentro da população de CD4<sup>+</sup> total. (B) MFI da produção de IL10 por Tregs e por Tr1. Barra de erro representada em vermelho.

## 5 DISCUSSÃO

A resolução das infecções causadas por vírus como dengue, West Nile, influenza, entre outros, são bastante variáveis. É possível encontrar indivíduos que desenvolvem uma doença assintomática ou infecção subclínica, bem como uma pequena minoria das pessoas que desenvolvem doenças mais graves que podem ser letais (ROUSE; SEHRAWAT, 2010). Muitos estudos buscaram compreender melhor a patologia encontrada na dengue grave. Já se sabe que uma infecção primária confere proteção por um longo período ao sorotipo homólogo (MATHEW; ROTHMAN, 2008). Porém, durante uma infecção secundária heterotípica, a presença de anticorpos não neutralizantes e com reatividade cruzada ao sorotipo da infecção primária poderá acarretar em uma viremia elevada, fenômenos como o ADE, e conseqüentemente a produção exacerbada de citocinas pelas células da imunidade inata e adaptativa, que caracterizaria a Tempestade de Citocinas (BELTRAMELLO *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2014).

Além do ADE, há também a hipótese do Pecado Antigênico Original, que é explicada pela presença de linfócitos T e B de memória, que foram induzidos por uma exposição primária por um sorotipo diferente ao da infecção secundária, mas que são capazes de responder mais rapidamente que as células T virgens durante a infecção secundária heterotípica aguda. Entretanto, segundo essa hipótese, estes linfócitos de memória não possuiriam uma ótima avidéz aos epítomos correspondentes ao novo vírus, e por existir uma certa preferência na ativação de células T de memória em comparação às células T virgens, a resposta que será montada não seria a mais adequada para eliminar o novo sorotipo viral desencadeando assim uma Tempestade de Citocinas ainda mais intensa (ZOMPI; HARRIS, 2013).

A grande maioria dos estudos em dengue buscaram elucidar as causas da patogênese da doença, e se concentram em investigar os efeitos das respostas inflamatórias. Foi demonstrado que fatores vasoativos, como receptor de TNF solúvel, e a produção excessiva de citocinas, como IFN, estão associados à dengue grave (BETHELL *et al.*, 1998; GREEN *et al.*, 1999), TNF pode agir diretamente sobre as células endoteliais vasculares e induzir o extravasamento vascular sistêmico (PANG; CARDOSA; GUZMAN, 2007) e elevados níveis de IL-1beta, IL-8, TNF e MCP-1 também estão associadas a permeabilidade vascular encontrada na dengue (BOZZA *et al.*, 2008). No entanto, contrapondo aos achados citados acima, em nossa coorte, observamos que os pacientes com dengue sa+/grave apresentaram uma escassa resposta inflamatória, enquanto que os níveis



plasmáticos de  $\text{IFN}\gamma$ , TNF e IL12p70 estavam elevados em pacientes com dengue leve durante a fase crítica da doença. As diferenças encontradas entre o nosso trabalho e os citados acima pode ser o tempo analisado. Enquanto nós nos concentramos na pós-febril, aqueles analisaram o período febril, o que nos leva a especular que apesar de uma alta produção precoce de citocinas, indivíduos que desenvolvem dengue sa+/grave não conseguem sustentar esses níveis. A produção sustentada de citocinas em contraste com a produção não sustentada pode sugerir fontes de citocinas diferentes entre pacientes com dengue leve ou dengue sa+/grave. Em nosso trabalho, verificamos que indivíduos com dengue leve apresentam uma fonte adaptativa importante para as citocinas analisadas, enquanto os indivíduos com dengue sa+/grave tiveram uma ativação de linfócitos T específicos para DENV modesta. Nossos resultados, entretanto, concordam com os trabalhos de (HATCH *et al.*, 2011; MATHEW; TOWNSLEY; ENNIS, 2014), que relataram altos níveis de células T  $\text{CD4}^+$  produtoras de citocinas TNF e  $\text{IFN}\gamma$  em pacientes com melhor prognóstico à infecção pelo DENV. Estas diferenças podem ser ainda maiores nos tecidos, de certa forma, os níveis sistêmicos seriam representativos de apenas parte da Tempestade de Citocinas. De fato, foi recentemente demonstrada a presença de intensa proliferação e ativação de linfócitos T específicos ao DENV na pele durante infecção aguda (RIVINO *et al.*, 2015).

Os linfócitos T específicos ao DENV reconhecem as células infectadas com vírus e respondem com um diverso grupo de funções efetoras, como proliferação, formação de células de memória, lise das células alvo e produção de citocinas. O padrão de produção destas citocinas segue o perfil de Th1, ou seja, produção principalmente de  $\text{IFN}\gamma$ , TNF, IL2 e CCL4, e menos comumente das citocinas de perfil Th2 como IL4 (IMRIE *et al.*, 2007; MANGADA, M. M.; ROTHMAN, 2005). Em dengue, a ativação dos linfócitos é essencial na resistência à infecção e está altamente associada a uma produção robusta e sustentada de  $\text{IFN}\gamma$  (DUANGCHINDA *et al.*, 2010; MANGADA, MARLOU M *et al.*, 2002).

A evolução nas ferramentas de estudo das respostas imunes nos permitiu enxergar as multifunções que as células T podem exercer, mostrando que de uma única célula pode ser fonte de mais de uma citocina. Embora existam poucos relatos analisando células T multifuncionais em dengue, as células T  $\text{CD4}^+$  produtoras de  $\text{IFN}\gamma^+\text{TNF}^+\text{IL2}^+$  parecem estar associadas a uma resposta a vacina contra a dengue (CHU *et al.*, 2015; LINDOW *et al.*, 2012). Em nosso trabalho, observamos que indivíduos que desenvolvem dengue leve durante a fase crítica têm aumento nas frequências das populações de células T  $\text{CD8}^+$  duplo produtoras de  $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}$  específicas ao

DENV quando comparado com sa+/grave e controle. E ainda, essa frequência elevada de células T CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>IL10<sup>-</sup> correlaciona-se positivamente com níveis mais altos de plaquetas, sugerindo associação com resistência à infecção por DENV.

Além de uma resposta inflamatória eficiente, os pacientes da nossa coorte com dengue leve também apresentaram um adequado perfil regulador, inclusive com a produção de IL10 específica para antígenos virais. A citocina anti-inflamatória IL10 pode ser produzida por muitos tipos celulares como dendríticas ativadas, macrófagos infectados com vírus, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, Tregs ativadas, células B e alguns subgrupos de NK, quando estimuladas com ligantes de TLR (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). As atividades da IL10 podem interferir em muitas vias de sinalização que promovem a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo inibindo a sinalização de NF-kB, suprimindo a transdução de sinal de IFN do tipo I, inibindo a expressão de MHC-II, entre outras ações (MOORE *et al.*, 2001).

Em dengue, o papel da IL10 tem sido motivo de muito debate. Enquanto alguns relatos associam a IL10 a uma evolução favorável das infecções em geral, incluindo a dengue, outros encontram a IL10 associada às respostas imunes prejudicadas e manifestações hemorrágicas da dengue. Acreditamos que a fonte celular de IL10 pode ter implicações importantes nesses achados divergentes. A maioria das evidências que ligam a IL10 à piora clínica da dengue são de relatos que avaliam seus níveis plasmáticos durante uma fase muito inicial (principalmente do período febril) da infecção e, principalmente, não avaliam a fonte. Por outro lado, a maioria das evidências que ligam a IL10 a uma evolução favorável de doenças infecciosas avalia a IL10 derivada de células T. O trabalho de (SUN *et al.*, 2009) demonstrou que durante uma infecção aguda de camundongos por influenza, a produção de IL10 por células T efectoras específicas ao vírus influenza, minimizou a severidade das lesões pulmonares (SUN *et al.*, 2009). Como já mencionamos, várias células podem produzir IL10. Nossos resultados demonstraram altos níveis de IL10 circulante em ambos os grupos de dengue leve e sa+/grave durante a fase crítica. Entretanto, a origem da IL10 pode ser diferente entre estes grupos.

Em nosso trabalho, focamos na IL10 derivada dos mecanismos reguladores da imunidade adaptativa, especialmente quando associada a uma resposta imune eficaz contra a infecção por DENV. Inicialmente podemos observar que as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> oriundas de pacientes com dengue leve produziram IL10 específico ao DENV, porém o mesmo não foi observado em sa+/grave (dados não mostrados), que sugere que os pacientes com dengue leve possuem um

mecanismo de controle das respostas pró-inflamatórias sem detrimento da resposta efetiva, contribuindo para a melhor evolução clínica da doença. Além disso, pacientes com dengue leve, durante a fase crítica e de convalescência, apresentaram maiores frequências de células T CD4<sup>+</sup>, bem como células T CD8<sup>+</sup>, ambas simples produtoras de IL10 específicas ao DENV comparado com pacientes com sa+/grave e controle. Outros trabalhos também já haviam demonstrado esta plasticidade das células CD8<sup>+</sup> em produzir a citocina anti-inflamatória IL10. Por exemplo, em indivíduos infectados com HIV as células T CD8<sup>+</sup> produziram IL10 e suprimiram a produção de IL2 (ELREFAEI *et al.*, 2007).

Nossos dados indicam que em dengue leve a IL10 provém da resposta imune adaptativa, enquanto que a fonte provável da IL10 para os sujeitos com sa+/grave parece ser o sistema inato, já que não encontramos produção de IL10 pelos linfócitos T destes pacientes. A ausência de células T produzindo IL10 em pacientes com sa+/grave sugere que a falta de controle da resposta inflamatória pode estar associada as complicações observadas durante a evolução clínica dos pacientes classificados como sa+/grave o que contribui para a imunopatologia. Outros estudos também relatam que a ausência da sinalização de IL10 pode impedir o controle das respostas inflamatórias e conseqüentemente contribuir para apresentações clínicas mais graves. Por exemplo, a falta de IL10 resulta em reações inflamatórias mais graves durante a infecção ocular pelo vírus herpes simples em modelo experimental (SARANGI *et al.*, 2008). Além disso, a supressão da resposta de IL10 por células T efetoras parecem contribuir para o aumento de patogênese das cepas de H1N1 e H5N5 (KOBASA *et al.*, 2007).

A quantidade de IL10 que é produzida durante uma infecção pode influenciar a magnitude de danos teciduais. Portanto, se a resposta de IL10 for ausente ou estiver suprimida, as reações inflamatórias contra os agentes infecciosos poderão ser exageradas. A atividade protetora da IL10 pode ser observada durante as infecções crônicas, como HCV e HIV, nas quais, a função anti-inflamatória da IL10 contém a gravidade das reações inflamatórias (BROCKMAN *et al.*, 2009; MANGIA *et al.*, 2004; NAICKER *et al.*, 2009). Portanto o que podemos esperar de uma resposta imune eficiente que elimine os patógenos, é uma resposta inflamatória adequada e controlada. Neste sentido as células T que produzem simultaneamente IL10 e IFN $\gamma$  são de especial interesse porque foram associadas a resistência às infecções virais ou protozoárias em conjunto com uma redução na patologia relacionada as doenças causadas por estes agentes patogênicos. Por exemplo

em um estudo que a frequência elevada de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN $\gamma$  e IL10 controlaram a infecção aguda por *Trypanosoma cruzi* em camundongos (ROFFE *et al.*, 2012).

Observamos que pacientes com dengue leve apresentaram frequências mais altas de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> duplo produtoras de IFN $\gamma$ /IL10 ou TNF/IL10 específicas ao DENV comparado com sa+/grave. E também células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> triplo produtoras IFN $\gamma$ /TNF/IL10, especialmente em resposta ao antígeno NS3. Nossos dados mostram algumas flutuações em relação às diferenças entre os grupos dengue leve e sa+/grave de acordo com o tempo da infecção. Enquanto algumas populações de células T duplo produtoras estavam elevadas na circulação de dengue leve durante a fase crítica, outras estavam elevadas apenas durante a convalescência. Esses dados sugerem uma homeostase dinâmica das células T ao longo da infecção.

As células T multifuncionais também precisam ser melhor estudadas com relação a capacidade de produção de citocinas. Por exemplo, trabalhos de (LINDOW *et al.*, 2012) demonstraram que as células T multifuncionais IFN $\gamma$ /TNF/IL2, embora em menor número, produziram níveis mais altos de citocinas. De forma semelhante, também observamos que as células T triplo produtoras de IFN $\gamma$ /TNF/IL10 específicas ao DENV apresentaram um nível maior de acúmulo intracelular de citocinas, comparado com as células T duplo e simples produtoras. Outra questão seria o tempo de meia vida destas células, como foi recentemente demonstrado para as células T multifuncionais IL2<sup>+</sup> em que o tempo de vida da produção de múltiplas citocinas foi menor comparado com as células T simples produtoras, apesar disso, o equilíbrio entre a produção múltipla e única foi muito dinâmica (CHU *et al.*, 2015). Em nosso trabalho não realizamos análises semelhantes, mas observamos uma flutuação interessante entre as fases críticas à convalescente nas frequências de células T IL10<sup>+</sup> duplo ou triplo produtoras.

Dentre as grandes fontes de IL10 do sistema imunológico, devemos considerar as células Tregs, que em humanos caracterizam-se pela expressão das moléculas CD25<sup>hi</sup>, CD127<sup>low</sup> e FoxP3<sup>+</sup> (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012). As Tregs eficientemente controlam as células T efetoras e células da resposta inata, prevenindo respostas exacerbadas tanto em infecções agudas quanto crônicas, conseqüentemente minimizando os danos colaterais nos tecidos (CAMPBELL, 2015). As células Tregs suprimem a proliferação de células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN $\gamma$ , TNF e IL6, por meio de dois mecanismos principais: liberação de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$  e IL10, e por meio de contato através da interação de moléculas reguladoras, tais como GITR, CD200, LAP, PD1, CD226, CTLA4 e LAG3, expressos

nas Tregs, com seus respectivos receptores presentes nas APCs e células T efectoras (BELKAID; V. TARBELL, 2009; JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012).

Alguns trabalhos fornecem evidências convincentes para o papel de células Tregs expressando FoxP3 em um largo número de infecções experimentais e humanas (BELKAID; V. TARBELL, 2009). Por exemplo, a depleção das Tregs de camundongos antes da infecção por HSV resulta em lesões mais graves e a indução da doença ocorre com doses de vírus infectivos menores (SUVAS *et al.*, 2004). Em outro estudo, foi demonstrado que a letalidade de camundongos infectados com WNV e o desenvolvimento sintomático da doença em indivíduos com WNV, estão relacionados a baixa frequência de células Tregs quando comparados com os indivíduos assintomáticos (LANTERI *et al.*, 2009). Outros trabalhos demonstraram que o aumento da proporção de Tregs limitou as reações imunopatológicas induzidas pela infecção por HSV (SARANGI *et al.*, 2008; SEHRAWAT *et al.*, 2008). Até o momento, o único trabalho publicado que avaliou Tregs em dengue não encontrou diferença na frequência das células Tregs entre os grupos dengue leve e sa+/grave, nem observou se a dengue induziria disfunção das Tregs (LÜHN *et al.*, 2007). Em nosso trabalho, nós avaliamos marcadores funcionais e observamos que há grandes diferenças em diversos marcadores quando se compara indivíduos com dengue leve ou dengue sa+/grave.

Aliás, apenas observar a frequência de células Tregs pode ser insuficiente para uma conclusão sobre sua real participação em doenças inflamatórias. Sabe-se que a expressão dos receptores inibitórios presentes nas células do sistema imune inato e adaptativo é um dos mecanismos usados para regular a magnitude da resposta pró-inflamatória. Embora não esteja claro como a infecção leva à expressão destes receptores inibitórios em células T, alguns trabalhos demonstram que componentes virais como as proteínas nucleicas do HCV, ligantes TLRs (YAO *et al.*, 2007) ou mesmo os IFNs induzidos por vírus (MAIER *et al.*, 2007) apresentam um papel nessa indução (BOASSO *et al.*, 2008). Além disso, acredita-se que a expressão de moléculas inibitórias seja um dos mais eficientes mecanismos pelos quais as células Tregs exercem sua função (ROUSE; SEHRAWAT, 2010).

O nosso trabalho demonstrou um aumento significativo nas populações de células Tregs GITR<sup>+</sup> e Tregs CD200<sup>+</sup> em indivíduos com dengue leve. A presença de células Tregs CD200<sup>+</sup> pode estar contribuindo para uma eficaz resolução da inflamação através da ligação com o receptor (CD200R), inibindo a resposta imune inata (KARNAM *et al.*, 2012). Por outro lado, a molécula

GITR é importante no desenvolvimento das células Tregs e na regulação da resposta Th1 (SNELL *et al.*, 2010). Além dessas moléculas, observamos que a infecção por dengue induz um aumento na frequência de células Tregs CTLA4<sup>+</sup> presentes ao longo da fase crítica até a convalescência. Interessantemente, pacientes com dengue apresentaram maiores frequências de células Tregs expressando CD226, mas uma redução importante na densidade na membrana celular. Apesar de não haver diferenças entre as classificações clínicas da dengue quanto a presença e densidade de Tregs CD226<sup>+</sup>, especulamos que o aumento na mobilização de Tregs durante a dengue aguda possa estar associada à maior número de células expressando essa molécula, mas a redução da sua densidade na fase aguda possa se associar à liberação molecular para as Tregs executarem mecanismos efetores. Por outro lado, o repertório de moléculas reguladoras entre Tregs de pacientes com dengue leve e dengue sa+/grave é distinto. Enquanto pacientes com dengue leve apresentam aumento de CD200 e GITR nas fases aguda e convalescente, pacientes com dengue sa+/grave apresentam aumento apenas de LAG3 na fase de convalescência. Essa observação sugere diferentes funcionalidades entre as Tregs de pacientes com dengue leve e dengue sa+/grave. Estamos ainda investigando diferenças funcionais entre as Tregs desses diferentes grupos de pacientes com dengue, mas trabalhamos com a hipótese de disfunção reguladora de células Tregs com pacientes com as formas graves de dengue.

As células Tregs são uma das principais fontes de IL10 no compartimento adaptativo, estudos mostram que as células Tregs possuem um papel benéfico tanto na resolução de infecções virais crônicas – como a causada pelo HCV, que apresenta elevada produção de IL10 por Tregs (MACDONALD *et al.*, 2002), quanto de infecções agudas, como as causadas por protozoários (MONTES DE OCA *et al.*, 2016; ROFFE *et al.*, 2012). Em nosso trabalho, ao avaliarmos a produção de IL10 pelas células Tregs, encontramos um aumento significativo na frequência de Tregs específicas ao vírus e produtoras de IL10, porém apenas nos pacientes com dengue leve durante a convalescência. Observamos também que as Tregs produtoras de IL10 específicas são as mesmas células Tregs que expressam GITR, mas não CD200, sugerindo dois principais mecanismos reguladores mediados pelas células Tregs em dengue: contato para as Tregs CD200<sup>+</sup> e contato e produção de IL10 para as Tregs GITR<sup>+</sup> específicas ao DENV.

As células Tregs podem ser oriundas do Timo (tTregs) ou induzidas na periferia (iTregs). Observamos que a produção de IL10 específica ao DENV por Tregs não se limitava apenas aos pacientes com dengue leve, o mesmo pôde ser visto quando se tratava das células Tregs

provenientes de voluntários controle, sugerindo então que estas células poderiam se tratar de células tTregs. Em humanos foi demonstrado que as Tregs que expressam Helios são provenientes do Timo, portanto são tTregs (FONTENOT, J. D. *et al.*, 2005; GETNET *et al.*, 2010; SUGIMOTO *et al.*, 2006). Observamos que as células Tregs produtoras de IL10 específicas ao DENV expressam Helios, portanto os pacientes com dengue leve apresentam um importante componente regulador mediado pelas células tTregs GITR<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> específicas ao DENV.

As células Tr1 são outra fonte de produção de IL10 que contribuem para limitar a inflamação. Por exemplo, foi relatada uma via de regulação da patologia mediada por TNF, em malária e leishmaniose visceral, através da produção de IL10 pelas células Tr1, de um modo dependente de Blimp-1 (MONTES DE OCA *et al.*, 2016). Em nosso trabalho, observamos que há uma frequência relevante de Tr1 produtoras de IL10, dentro da população de CD4, em comparação com a frequência de Tregs. Entretanto, os níveis intracelulares de IL10 encontrado nas células Tregs são significativamente maiores que os das células Tr1. O que sugere que as Tr1 contribuem para limitar a inflamação em dengue, mas em menor desempenho em relação aos outros mediadores reguladores estudados neste trabalho, as células T multifuncionais IL10<sup>+</sup> específicas ao DENV, as Tregs CD200<sup>+</sup> e as Tregs GITR<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> específicas ao DENV.

## 6 CONCLUSÕES

As citocinas de perfil pró-inflamatório  $IFN\gamma$  e TNF estão circulantes em pacientes com dengue leve, apesar de não encontramos em pacientes com dengue sa+/grave nos tempos que investigamos. Além disso, a fonte produtora destas citocinas,  $IFN\gamma$  e TNF, em pacientes com dengue leve parecem ser as células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  específicas ao DENV.

Contraopondo o perfil pró-inflamatório, os pacientes com dengue leve apresentaram maiores frequências de células T multifuncionais  $IL10^+$  e de células T simples produtoras de IL10 comparado com pacientes com dengue sa+/grave. Demonstrando a presença de um importante mecanismo de controle da resposta inflamatória em pacientes que têm a dengue mais branda.

Nossos resultados sugerem que, uma adequada resposta inflamatória mediada por  $IFN\gamma$  e TNF para combater a infecção, somado a mecanismos reguladores mediados por células T multifuncionais  $IL10^+$ , células tTregs  $GITR^+ IL10^+$ , células Tregs  $CD200^+$  encontrado nos indivíduos com dengue leve, efetivamente contribuem para a resolução apropriada da infecção, levando à melhor evolução clínica da doença.



## 8 REFERÊNCIAS

ALEJO, A. *et al.* Chemokines cooperate with TNF to provide protective anti-viral immunity and to enhance inflammation. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 1790–1790, 1 Dec. 2018.

ALI, N. A. *et al.* Latency associated peptide has in vitro and in vivo immune effects independent of TGF- $\beta$ 1. *PLoS ONE*, v. 3, n. 4, 2008.

ANDERSON, C. F. *et al.* CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 204, n. 2, p. 285–297, 2007. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20061886>>.

ANNES, J. P. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*, v. 116, n. 2, p. 217–224, 2003. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00229>>.

AUSTIN, S. K. *et al.* Structural Basis of Differential Neutralization of DENV-1 Genotypes by an Antibody that Recognizes a Cryptic Epitope. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 10, 2012.

BARCLAY, A. NEIL *et al.* CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends in Immunology*, v. 23, n. 6, p. 285–290, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490602022238>>.

BARCLAY, A N; CLARK, M. J.; MCCAUGHAN, G. W. Neuronal/lymphoid membrane glycoprotein MRC OX-2 is a member of the immunoglobulin superfamily with a light-chain-like structure. *Biochem Soc Symp*, v. 51, p. 149–157, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2880589>>.

BARTENSCHLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiology*, v. 3, n. 2, p. 155–165, 2008. Disponível em: <[http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L351984064%5Cnhttp://dx.doi.org/10.2217/17460913.3.2.155%5Cnhttp://sfxit.ugent.be/ugent?sid=EMBASE&issn=17460913&id=doi:10.2217%2F17460913.3.2.155&atitle=Molecular+aspects+of+Dengue+](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L351984064%5Cnhttp://dx.doi.org/10.2217/17460913.3.2.155%5Cnhttp://sfxit.ugent.be/ugent?sid=EMBASE&issn=17460913&id=doi:10.2217%2F17460913.3.2.155&atitle=Molecular+aspects+of+Dengue+>)>.

BEDOYA, F. *et al.* Viral Antigen Induces Differentiation of Foxp3+ Natural Regulatory T Cells in Influenza Virus-Infected Mice. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 12, p. 6115–6125, 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1203302>>.

BELKAID, Y. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature*, v. 420, n. 6915, p. 502–507, 5 Dec. 2002.

BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. *Natural regulatory T cells in infectious disease. Nature Immunology*. [S.l.: s.n.], 2005

BELKAID, Y.; V. TARBELL, K. *Arming Treg Cells at the Inflammatory Site. Immunity*. [S.l.: s.n.], 2009

BELTRAMELLO, M. *et al.* The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host and Microbe*, v. 8, n. 3, p. 271–283, 2010.

BETHELL, D. B. *et al.* Pathophysiologic and Prognostic Role of Cytokines in Dengue Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 177, n. 3, p. 778–782, 1 Mar. 1998. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/517807>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

BIANCHINI, R. *et al.* CD4(+) CD25(low) GITR(+) cells: a novel human CD4(+) T-cell population with regulatory activity. *European journal of immunology*, v. 41, p. 2269–2278, 2011.

BILATE, A. M.; LAFAILLE, J. J. *Can TNF-?? boost regulatory T cells? Journal of Clinical Investigation*. [S.l: s.n.], , 2010

BOASSO, A. *et al.* HIV-Induced Type I Interferon and Tryptophan Catabolism Drive T Cell Dysfunction Despite Phenotypic Activation. *PLoS ONE*, v. 3, n. 8, p. e2961, 13 Aug. 2008. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002961>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

BOZZA, F. A. *et al.* Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infectious Diseases*, v. 8, p. 86, 25 Jun. 2008.

BRADY, O. J. *et al.* Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 8, 2012.

BROCKMAN, M. A. *et al.* IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood*, v. 114, n. 2, p. 346–356, 2009.

CAMPBELL, D. J. Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. *The Journal of Immunology*, v. 195, n. 6, p. 2507–2513, 15 Sep. 2015.

CHAUDHRY, A. *et al.* CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science (New York, N.Y.)*, v. 326, n. 5955, p. 986–991, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4408196&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CHEN, M.-L. *et al.* Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 180, n. 11, p. 7327–37, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2771858&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CHU, H. *et al.* CD8+T-cell responses in flavivirus-naive individuals following immunization with a live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate. *Journal of Infectious Diseases*, v. 212, n. 10, p. 1618–1628, 2015.

COFFEY, L. L. *et al.* Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes and Infection*. [S.l: s.n.], , 2009

COLES, S. J. *et al.* Increased CD200 expression in acute myeloid leukemia is linked with an increased frequency of FoxP3 + regulatory T cells. *Leukemia*. [S.l: s.n.], , 2012

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*, v. 180, n. 9, p. 5771–5777, 1 May 2008.

- CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity*, v. 30, n. 5, p. 626–635, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.002>>.
- DEJNIRATTISAI, W. *et al.* A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 181, n. 9, p. 5865–5874, 2008.
- DEJNIRATTISAI, W. *et al.* Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*, v. 328, n. 5979, p. 745–748, 2010.
- DITTMER, U. *et al.* Functional impairment of CD8+ T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity*, v. 20, n. 3, p. 293–303, 2004.
- DUAN, W. *et al.* Inducible CD4+LAP+Foxp3- regulatory T cells suppress allergic inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 187, n. 12, p. 6499–507, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3237738&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- DUANGCHINDA, T. *et al.* Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 39, p. 16922–16927, 2010. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010867107>>.
- ELREFAEI, M. *et al.* HIV-Specific IL-10-Positive CD8 + T Cells Suppress Cytotoxicity and IL-2 Production by CD8 + T Cells . *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 5, p. 3265–3271, 1 Mar. 2007.
- FERRARA, J. L. M. Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Current Opinion in Immunology*, v. 5, n. 5, p. 794–799, 1993.
- FISCHL, W.; BARTENSCHLAGER, R. *Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. Current Opinion in Microbiology*. [S.l: s.n.], 2011
- FLORES-GARCÍA, Y. *et al.* IL-10-IFN- $\gamma$  double producers CD4+ T cells are induced by immunization with an amastigote stage specific derived recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Biological Sciences*, v. 7, n. 7, p. 1093–1100, 2011.
- FONTENOT, J. D. *et al.* Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*, v. 22, n. 3, p. 329–341, 2005.
- FONTENOT, J.; GAVIN, M.; RUDENSKY, A. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*, v. 4, n. 4, p. 330–6, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612578%5Cnhttp://www.nature.com/ni/journal/v4/n4/abs/ni904.html>>.
- FRANCIS, T. J. On the Doctrine of Original Antigenic Sin. *Proceedings of the American Philosophical Society*, v. 104, n. 6, p. 572–578, 1960.
- FRANCISCO, L. M.; SAGE, P. T.; SHARPE, A. H. *The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. Immunological Reviews*. [S.l: s.n.], 2010
- FREITAS DO ROSARIO, A. P. *et al.* IL-27 Promotes IL-10 Production by Effector Th1 CD4+ T Cells: A Critical Mechanism for Protection from Severe Immunopathology during Malaria Infection. *The Journal*

of *Immunology*, v. 188, n. 3, p. 1178–1190, 2012. Disponível em:  
<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1102755>>.

FUCHS, A.; COLONNA, M. *The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. Seminars in Cancer Biology*. [S.l.]: Academic Press. , 1 Oct. 2006

FUHRMAN, C. A. *et al.* Divergent Phenotypes of Human Regulatory T Cells Expressing the Receptors TIGIT and CD226. *The Journal of Immunology*, v. 195, n. 1, p. 145–155, 1 Jul. 2015.

GAISER, Maria Rita *et al.* Merkel cell carcinoma expresses the immunoregulatory ligand CD200 and induces immunosuppressive macrophages and regulatory T cells. *OncImmunity*, 2018.

GANDHI, R. *et al.* Cutting edge: human latency-associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 184, n. 9, p. 4620–4, 2010. Disponível em:  
<<http://www.jimmunol.org/content/184/9/4620.full>>.

GANDHI, R.; ANDERSON, D. E.; WEINER, H. L. Cutting Edge: Immature human dendritic cells express latency-associated peptide and inhibit T cell activation in a TGF-beta-dependent manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 178, n. 7, p. 4017–4021, 2007.

GETNET, D. *et al.* A role for the transcription factor Helios in human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Molecular Immunology*, v. 47, n. 7–8, p. 1595–1600, 2010. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2010.02.001>>.

GORCZYNSKI, R. M.; LEE, L.; BOUDAKOV, I. Augmented induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD200R. 2005, [S.l.: s.n.], 2005. p. 1180–1183.

GREEN, S. *et al.* Early Immune Activation in Acute Dengue Illness Is Related to Development of Plasma Leakage and Disease Severity. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 179, n. 4, p. 755–762, 1 Apr. 1999. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/314680>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

GURNEY, A. L. *et al.* Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Current biology*, v. 9, n. 4, p. 215–218, 1999.

GUY, B. *et al.* Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. *Vaccine*, v. 33, n. 50, p. 7100–7111, 2015.

GUZMAN, MARIA G. *et al.* Dengue: A continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 12, p. S7–S16, 2010.

GUZMAN, MARÍA G. *et al.* Dengue. *International Encyclopedia of Public Health*, v. 366, n. 15, p. 233–257, 2016. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494122>>  
<<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1313875>>.

GUZMAN, MARIA G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. *Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. Archives of Virology*. [S.l.: s.n.], , 2013

HALSTEAD, S. B.; COHEN, S. N. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts

- of Causation and Treatment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 79, n. 3, p. 281–291, 2015. Disponível em: <<http://mmbbr.asm.org/lookup/doi/10.1128/MMBR.00009-15>>.
- HATCH, S. *et al.* Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 203, n. 9, p. 1282–1291, 2011.
- HEINEMANN, C. *et al.* IL-27 and IL-12 oppose pro-inflammatory IL-23 in CD4<sup>+</sup>T cells by inducing Blimp1. *Nature Communications*, v. 5, n. May, p. 1–13, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4770>>.
- HOEK, R. H. *et al.* Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*, v. 290, n. 5497, p. 1768–1771, 2000.
- HORI ET AL., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, v. 299, n. 5609, p. 1057–61, 2003.
- HUANG, C. T. *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, v. 21, n. 4, p. 503–513, 2004.
- HUARD, B. *et al.* CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *European Journal of Immunology*, v. 25, n. 9, p. 2718–2721, 1995.
- HUE, K. D. T. *et al.* Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *Journal of Virological Methods*, v. 177, n. 2, p. 168–173, 2011.
- IMRIE, A. *et al.* Differential Functional Avidity of Dengue Virus-Specific T-Cell Clones for Variant Peptides Representing Heterologous and Previously Encountered Serotypes. *Journal of Virology*, v. 81, n. 18, p. 10081–10091, 15 Sep. 2007.
- JAGANNATHAN, P. *et al.* IFN $\gamma$ /IL-10 Co-producing Cells Dominate the CD4 Response to Malaria in Highly Exposed Children. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 1, 2014.
- JAIN, B.; CHATURVEDI, U. C.; JAIN, A. *Role of intracellular events in the pathogenesis of dengue; An overview. Microbial Pathogenesis*. [S.l.: s.n.], 2014
- JANKOVIC, D. *et al.* Conventional T-bet<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 204, n. 2, p. 273–283, 2007. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20062175>>.
- JAYARATNE, E. *et al.* Regulatory T cells in acute dengue viral infection. *Immunology*, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29140541><http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12863>>.
- JENMALM, M. C. *et al.* Regulation of Myeloid Cell Function through the CD200 Receptor. *The Journal of Immunology*, v. 176, n. 1, p. 191–199, 2006. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.176.1.191>>.
- JOHNSON, M. L. *et al.* Heparinase treatment of RNA before quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques*, v. 35, n. 6, p. 1140–1144, 2003.
- JOSEFOWICZ, S. Z.; LU, L.-F.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation

- and Function. *Annual Review of Immunology*, v. 30, n. 1, p. 531–564, 2012. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>>.
- KARNAM, G. *et al.* CD200 Receptor Controls Sex-Specific TLR7 Responses to Viral Infection. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 5, p. e1002710, 17 May 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002710>>. Acesso em: 11 mar. 2020.
- KHATTRI, R. *et al.* An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol*, v. 4, n. 4, p. 337–342, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612581>>.
- KINTER, A. L. *et al.* CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells from the Peripheral Blood of Asymptomatic HIV-infected Individuals Regulate CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> HIV-specific T Cell Immune Responses In Vitro and Are Associated with Favorable Clinica. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 200, n. 3, p. 331–343, 2004. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20032069>>.
- KOBASA, D. *et al.* Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature*, v. 445, n. 7125, p. 319–323, 18 Jan. 2007.
- LANTERI, M. C. *et al.* Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 11, p. 3266–3277, 2 Nov. 2009.
- LINDOW, J. C. *et al.* Primary vaccination with low dose live dengue 1 virus generates a proinflammatory, multifunctional T cell response in humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 7, p. 1–10, 2012.
- LIU, W. *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 203, n. 7, p. 1701–1711, 2006. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20060772>>.
- LUCAS, S. *et al.* IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4<sup>+</sup> T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 25, p. 15047–15052, 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2536517100>>.
- LUHN, K. *et al.* Increased frequencies of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>(high)</sup> regulatory T cells in acute dengue infection. *J Exp Med*, v. 204, n. 5, p. 979–985, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17452519>>.
- MACDONALD, A. J. *et al.* CD4 T Helper Type 1 and Regulatory T Cells Induced against the Same Epitopes on the Core Protein in Hepatitis C Virus–Infected Persons. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 185, n. 6, p. 720–727, 15 Mar. 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/339340>>. Acesso em: 11 mar. 2020.
- MAIER, H. *et al.* PD-1:PD-L1 Interactions Contribute to the Functional Suppression of Virus-Specific CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes in the Liver. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 5, p. 2714–2720, 1 Mar. 2007.
- MANGADA, M. M.; ROTHMAN, A. L. Altered Cytokine Responses of Dengue-Specific CD4<sup>+</sup> T Cells to Heterologous Serotypes. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 4, p. 2676–2683, 2005. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/175/4/2676.full>>.
- MANGADA, MARLOU M *et al.* Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *The Journal of infectious diseases*, v. 185, n. 12, p. 1697–1703, 2002.

- MANGIA, A. *et al.* IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. *Cytokine*, v. 25, n. 3, p. 103–109, 7 Feb. 2004.
- MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. *Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. Immunological Reviews*. [S.l.: s.n.], 2008
- MATHEW, A.; TOWNSLEY, E.; ENNIS, F. A. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. *Future Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 411–425, 2014. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.13.171>>.
- MONTES DE OCA, M. *et al.* Blimp-1-Dependent IL-10 Production by Tr1 Cells Regulates TNF-Mediated Tissue Pathology. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2016.
- MOORE, K. W. *et al.* INTERLEUKIN -10 AND THE INTERLEUKIN -10 RECEPTOR. *Annual Review of Immunology*, v. 19, n. 1, p. 683–765, 28 Apr. 2001.
- MOREIRA-TEIXEIRA, L. *et al.* T Cell-Derived IL-10 Impairs Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *The Journal of Immunology*, v. 199, n. 2, p. 613–623, 2017. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1601340>>.
- MOREIRA, L. A. *et al.* A Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, v. 139, n. 7, p. 1268–1278, 2009.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. *A structural perspective of the Flavivirus life cycle. Nature Reviews Microbiology*. [S.l.: s.n.], 2005
- MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. *Annual Review of Immunology*, v. 29, n. 1, p. 587–619, 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-031210-101315>>.
- NAICKER, D. D. *et al.* Interleukin-10 Promoter Polymorphisms Influence HIV-1 Susceptibility and Primary HIV-1 Pathogenesis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 200, n. 3, p. 448–452, Aug. 2009.
- NG, J. K. W. *et al.* First Experimental In Vivo Model of Enhanced Dengue Disease Severity through Maternally Acquired Heterotypic Dengue Antibodies. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 4, 2014.
- NOCENTINI, G. *et al.* A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 12, p. 6216–6221, 1997. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.94.12.6216>>.
- PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. *Of cascades and perfect storms: The immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). Immunology and Cell Biology*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1038/sj.icb.7100008>>. Acesso em: 11 mar. 2020. , 28 Jan. 2007
- PRESTON, S. *et al.* The leukocyte/neuron cell surface antigen OX2 binds to a ligand on macrophages. *European Journal of Immunology*, v. 27, n. 8, p. 1911–1918, 1997.
- READ, S.; MALMSTRÖM, V.; POWRIE, F. Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of Cd25 + Cd4 + Regulatory Cells That Control Intestinal Inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 192, n. 2, p. 295–302, 2000. Disponível em:

<<http://jem.rupress.org/content/192/2/295.full>>.

RIVINO, L. *et al.* Virus-specific T lymphocytes home to the skin during natural dengue infection. *Science Translational Medicine*, v. 7, n. 278, p. 278ra35-278ra35, 11 Mar. 2015.

ROFFE, E. *et al.* IL-10 Limits Parasite Burden and Protects against Fatal Myocarditis in a Mouse Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 2, p. 649–660, 2012. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1003845>>.

ROTHMAN, A. L. *Immunity to dengue virus: A tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms.* *Nature Reviews Immunology*. [S.l.: s.n.], 2011

ROUSE, B. T.; SEHRAWAT, S. *Immunity and immunopathology to viruses: What decides the outcome?* *Nature Reviews Immunology*. [S.l.: s.n.], 2010

SAKAGUCHI, S. *et al.* *Regulatory T Cells and Immune Tolerance.* *Cell*. [S.l.: s.n.], 2008

SAKISAKA, T.; TAKAI, Y. *Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules.* *Current Opinion in Cell Biology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15363801>>. Acesso em: 10 mar. 2020. , Oct. 2004

SARANGI, P. P. *et al.* IL-10 and Natural Regulatory T Cells: Two Independent Anti-Inflammatory Mechanisms in Herpes Simplex Virus-Induced Ocular Immunopathology. *The Journal of Immunology*, v. 180, n. 9, p. 6297–6306, 1 May 2008.

SEDDIKI, N. *et al.* Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 203, n. 7, p. 1693–1700, 2006. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20060468>>.

SEHRAWAT, S. *et al.* In Vitro-Generated Antigen-Specific CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Control the Severity of Herpes Simplex Virus-Induced Ocular Immunoinflammatory Lesions. *Journal of Virology*, v. 82, n. 14, p. 6838–6851, 15 Jul. 2008.

SHAFIANI, S. *et al.* Pathogen-Specific Treg Cells Expand Early during *Mycobacterium tuberculosis* Infection but Are Later Eliminated in Response to Interleukin-12. *Immunity*, v. 38, n. 6, p. 1261–1270, 2013.

SHIBUYA, K. *et al.* CD226 (DNAM-1) Is Involved in Lymphocyte Function-associated Antigen 1 Costimulatory Signal for Naive T Cell Differentiation and Proliferation. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 198, n. 12, p. 1829–1839, 2003. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20030958>>.

SHIMIZU, J. *et al.* Stimulation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunology*, v. 3, n. 2, p. 135–142, 2002.

SILVEIRA, G. F. *et al.* Human T Lymphocytes Are Permissive for Dengue Virus Replication. *Journal of Virology*, v. 92, n. 10, p. e02181-17, 7 Mar. 2018.

SNELL, L. M. *et al.* CD8 T Cell-Intrinsic GITR Is Required for T Cell Clonal Expansion and Mouse Survival following Severe Influenza Infection. *The Journal of Immunology*, v. 185, n. 12, p. 7223–7234, 15 Dec. 2010.



- SRIDHAR, S. *et al.* Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *New England Journal of Medicine*, v. 379, n. 4, p. 327–340, 26 Jul. 2018. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1800820>>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- SUAYA, J. A. *et al.* Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and asia: A prospective study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 5, p. 846–855, 2009.
- SUGIMOTO, N. *et al.* Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *International Immunology*, v. 18, n. 8, p. 1197–1209, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dx1060>>.
- SUN, J. *et al.* Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nature methods*, v. 15, n. 3, p. 277–284, 2009.
- SUVAS, S. *et al.* CD4 + CD25 + Regulatory T Cells Control the Severity of Viral Immunoinflammatory Lesions. *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 7, p. 4123–4132, 1 Apr. 2004.
- TEIXEIRA, M. G. *et al.* Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000–2010): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 12, p. e2520, 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002520>>.
- TIAN, Y. *et al.* IL-10 Regulates Memory T Cell Development and the Balance between Th1 and Follicular Th Cell Responses during an Acute Viral Infection. 2019.
- TILLU, H. *et al.* Altered profile of regulatory T cells and associated cytokines in mild and moderate dengue. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 35, n. 3, p. 453–461, 2015.
- TRAN, D. Q. *et al.* Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood*, v. 113, n. 21, p. 5125–5133, 2009.
- UBOL, S. *et al.* Mechanisms of Immune Evasion Induced by a Complex of Dengue Virus and Preexisting Enhancing Antibodies. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 201, n. 6, p. 923–935, 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/651018>>.
- VIEIRA MACHADO, A. A., ESTEVAN, A. O., SALES, A., BRABES, K. C. DA S., CRODA, J., & NEGRÃO, F. J. *Direct Costs of Dengue Hospitalization in Brazil: Public and Private Health Care Systems and Use of WHO Guidelines. PLoS Neglected Tropical Diseases*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.plosntds.org/index.php%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed18a&NEWS=N&AN=600082384>>. , 2014
- VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. *Nature Reviews: Immunology*, v. 8, n. 7, p. 523–532, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566595>>.
- WALKER, T. *et al.* The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, v. 476, n. 7361, p. 450–453, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21866159>>.

WANG, N. *et al.* CD226 attenuates Treg suppressive capacity via CTLA-4 and TIGIT during EAE. *Immunologic Research*, v. 67, n. 6, p. 486–496, 1 Dec. 2019.

WEI, X. Q. *et al.* The role of the IL-12 cytokine family in directing T-cell responses in oral candidosis. *Clinical and Developmental Immunology*. [S.l: s.n.]. , 2011

WEISKOPF, D.; SETTE, A. T-cell immunity to infection with dengue virus in humans. *Frontiers in Immunology*. [S.l: s.n.]. , 2014

WISE DE VALDEZ, M. R. *et al.* Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 12, p. 4772–4775, 2011. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1019295108>>.

WORKMAN, C. J. *et al.* Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates the Size of the Expanding T Cell Population Following Antigen Activation In Vivo. *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 9, p. 5450–5455, 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.172.9.5450>>.

WORKMAN, CREG J.; VIGNALI, D. A. A. *The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells.* *European Journal of Immunology*. [S.l: s.n.]. , 2003

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, p. x, 147, 2009. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)>.

WRIGHT, G. J. *et al.* The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology*, v. 102, n. 2, p. 173–179, 2001.

XU, Z.; JIN, B. *A novel interface consisting of homologous immunoglobulin superfamily members with multiple functions.* *Cellular and Molecular Immunology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 18 Jan. 2010

YAO, Z. Q. *et al.* T cell dysfunction by hepatitis C virus core protein involves PD-1/PDL-1 signaling. *Viral Immunology*, v. 20, n. 2, p. 276–287, 30 Jun. 2007.

YU, X. *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature Immunology*, v. 10, n. 1, p. 48–57, 16 Nov. 2009.

ZELLWEGER, R. M. *et al.* CD8+ T cells prevent antigen-induced antibody-dependent enhancement of dengue disease in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 193, n. 8, p. 4117–24, 2014.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25217165><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4185219>>.

ZELLWEGER, R. M.; PRESTWOOD, T. R.; SHRESTA, S. Enhanced Infection of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in a Mouse Model of Antibody-Induced Severe Dengue Disease. *Cell Host & Microbe*, v. 7, n. 2, p. 128–139, 2010. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312810000302>>.

ZHENG, Y.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol*, v. 8, n. 5, p. 457–462, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440451>>.

ZOMPI, S.; HARRIS, E. *Original antigenic sin in dengue revisited.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [S.l.]: National Academy of Sciences. , 28 May 2013


## ANEXO 1

Immunology  
The Journal of cells, molecules, systems and technology

British Society for  
immunology

IMMUNOLOGY ORIGINAL ARTICLE

## T-cells producing multiple combinations of IFN $\gamma$ , TNF and IL10 are associated with mild forms of dengue infection

Marcela Helena Gonçalves Pereira,<sup>1</sup> Maria Marta Figueiredo,<sup>2</sup> Camila Pereira Queiroz,<sup>1</sup> Têcia Vasconcelos Barros Magalhães,<sup>3</sup> Adriana Mafra,<sup>4</sup> Lilian Martins Oliveira Diniz,<sup>5</sup> Último Libânio da Costa,<sup>6</sup> Kenneth J. Gollob,<sup>7</sup> Lis Ribeiro do Valle Antonelli<sup>2</sup> and Helton da Costa Santiago<sup>1,8</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, <sup>2</sup>Instituto Rene Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, <sup>3</sup>Hospital Santa Casa BH, Belo Horizonte, <sup>4</sup>Hospital Metropolitano Odilon Behrens, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, <sup>5</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, <sup>6</sup>Secretaria Municipal de Saúde, Belo Horizonte, <sup>7</sup>International Research Center, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil and <sup>8</sup>Center for Immunization Research, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA

doi:10.1111/imm.13185

Received 5 December 2019; revised 12

February 2020; accepted 26 February 2020.

Correspondence: Helton da Costa Santiago, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 20270-901, Brazil.

Email: heltonsantiago@icb.ufmg.br

Senior author: Helton da Costa Santiago

### Summary

Multifunctional interleukin 10 (IL10)<sup>+</sup>Th1 cells have been implicated in favorable evolution of many infectious diseases, promoting an efficacious immune response while limiting immunopathology. Here, we investigated the presence of multifunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells that expressed interferon gamma (IFN $\gamma$ ), IL10 and tumor necrosis factor (TNF), or its combinations during dengue infection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from outpatients with dengue (mild dengue forms) and hospitalized patients (or patients with dengue with warning signs and severe dengue) were cultured in the presence of envelope (ENV) or NS3 peptide libraries of DENV during critical (hospitalization period) and convalescence phases. The production of IFN $\gamma$ , IL10 and TNF by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells was assessed by flow cytometry. Our data show that patients with mild dengue, when compared with patients with dengue with warning signs and severe dengue, presented higher frequencies of multifunctional T-cells like NS3-specific IFN $\gamma$ /IL10-producing CD4<sup>+</sup> T-cells in critical phase and NS3- and ENV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells producing IFN $\gamma$ /IL10. In addition, NS3-specific CD8<sup>+</sup> T-cells producing high levels of IFN $\gamma$ /TNF and IFN $\gamma$ /TNF/IL10 were also observed in the mild dengue group. We observed that multifunctional T-cells produced higher levels of cytokines as measured by intracellular content when compared with single producer T-cells. Importantly, multifunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells producing IFN $\gamma$ , TNF and IL10 simultaneously displayed positive correlation with platelet levels, suggesting a protective role of this population. The presence of IL10<sup>+</sup>Th1 and IL10<sup>+</sup>Tc1 multifunctional cells was associated with mild dengue presentation, suggesting that these cells play a role in clinical evolution of dengue infection.

**Keywords:** dengue; IL10<sup>+</sup>Tc1; IL10+Th1; immunoregulation; multifunctional T-cells.

### Introduction

Dengue fever is a mosquito-borne viral infection that is mainly characterized by a self-limited acute fever, which resolves spontaneously in most cases.<sup>1</sup> The World Health Organization (WHO) classifies clinical dengue as dengue without warning signs (mild dengue), dengue with warning signs (ws+) and severe dengue.<sup>1</sup> The mechanisms by which

the host develops mild or severe forms of dengue are unclear and may be associated with extrinsic factors, such as the virulence of the dengue virus (DENV),<sup>2</sup> or intrinsic host factors, especially the host's immunity status. Previously exposed individuals with heterotypic infection present higher chances of developing severe dengue,<sup>3</sup> associated to a phenomenon called antibody-dependent enhancement (ADE) in which heterotypic non-neutralizing

Abbreviations: DENV, dengue virus; ENV, envelope; IFN $\gamma$ , interferon gamma; IL10, interleukin 10; NS3, non-structural protein 3; Tc, T cytotoxic cells; Th, T helper cells; ws+, positive for warning signs

antibodies opsonize mature and immature virus particles, facilitating infection of mononuclear phagocytes and promoting virus replication.<sup>3</sup>

Interestingly, individuals that develop secondary dengue also present an increased chance of asymptomatic dengue presentation during heterologous infection.<sup>4,5</sup> Such resistance was associated with the presence of an efficient response of DENV-specific cross-reactive cytotoxic T lymphocytes producing interferon gamma (IFN $\gamma$ ).<sup>5,6</sup> Indeed, active CD8<sup>+</sup> T-cells against DENV can reduce viral load and prevent ADE in mice,<sup>7,8</sup> suggesting that lymphocyte activation is critical to DENV resistance. On the other hand, some authors propose that T-cell hyperactivation can be associated with the development of hemorrhagic manifestations.<sup>9,10</sup>

While details of the mechanisms that trigger severe dengue development are unclear, there is a consensus that hyperinflammatory status either from innate<sup>11</sup> or possibly adaptive immunity<sup>10</sup> activation is important. The pathways that lead to immune hyperactivation have been the subject of several investigations and speculations. In contrast, the mechanisms that regulate inflammation during dengue infection are poorly addressed. Although the activation and function of regulatory T-cells (Treg) in dengue infection have not been carefully investigated, it has been demonstrated that, although not functionally impaired during infection, the number of peripheral Tregs may be decreased in relation to effector cells<sup>12</sup> in severe cases of dengue. On the other hand, while transforming growth factor  $\beta$  levels have been associated with favorable evolution of dengue,<sup>13</sup> the role of another major regulatory cytokine, interleukin 10 (IL10), is still controversial. High serum levels of IL10 are found in severe dengue patients during early moments of clinical manifestations.<sup>14–16</sup> On the other hand, T-cell-derived IL10 has also been implicated in favorable evolution of several virus infections.<sup>17,18</sup> A very interesting study concluded that polymorphisms associated with low IL10 production can increase the chances for severe dengue presentation.<sup>19</sup> Importantly, there is evidence showing loss of coordinate regulation between the anti-inflammatory cytokine IL10 and the inflammatory cytokines IL6 and IL8 in patients with more severe disease.<sup>20</sup>

Interleukin 10 has been implicated in preventing hyperinflammation during various infectious diseases,<sup>17</sup> especially if produced by multifunctional T-cells. For example, pathogen-specific IL10<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells are associated with favorable evolution of malaria,<sup>21,22</sup> toxoplasmosis,<sup>23</sup> Chagas disease<sup>24,25</sup> and influenza.<sup>26</sup> In contrast, these multifunctional T-cells are associated with impaired effector responses to leishmaniasis<sup>27</sup> and tuberculosis,<sup>28</sup> but still considered an important mechanism to limit pathology to these same diseases.

There is little information about multifunctional T-cells in dengue infection,<sup>29–31</sup> especially with regard to

IL10<sup>+</sup>Th1 and IL10<sup>+</sup>Tc1 cells. In this work, we aimed to investigate the presence of these cells in different clinical forms of dengue infection. Because IL10<sup>+</sup>Th1 may also express other cytokines besides IL10 and IFN $\gamma$ ,<sup>32</sup> we decided also to investigate the production of tumor necrosis factor (TNF), a cytokine that possesses anti-viral properties<sup>33</sup> and has also been found in a subpopulation of T-cells producing IFN $\gamma$  simultaneously during DENV infections.<sup>30,31</sup> Therefore, in this work, we evaluated dengue patients for the presence of DENV-specific T-cells producing IFN $\gamma$ , TNF and/or IL10 at defervescence (critical) and convalescence phases of infection. We found that the IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>, IL10<sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>, in addition to IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup>, multifunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells were associated with mild dengue presentation. These results suggest that IL10<sup>+</sup> multifunctional T-cells may play a role in clinical evolution of dengue.

## Materials and methods

### Ethical statement

This study was carried out in Belo Horizonte, Minas Gerais, in a dengue-endemic area with seasonal transmission between 2013 and 2015. The study was reviewed and approved by the Institutional Review Board from Instituto René Rachou, Fiocruz-MG (CAAE: 30492014.9.0000.5091). All adult candidates or legal guardians (in the case of an underage participant) signed a consent form prior to their enrollment in the study. Underage teenagers signed an assent form. Outpatients were recruited at Primary Care Center Jardim Montanhês and Santo Ivo Hospital. Inpatients were recruited in Odilon Behrens Metropolitan Hospital, Santa Casa Hospital and João Paulo II Hospital. Healthy volunteers were recruited in the community.

### Clinical information, sample collection and processing

Classification between different clinical forms of dengue was performed according to WHO guidelines<sup>1</sup> by the attending physician at the moment of consenting, which was also responsible to collect illness symptoms and evolution and blood work results. Classification was reviewed retrospectively by an independent research physician. Dengue cases were classified in this study into two groups: (i) mild dengue (outpatients), cases of mild dengue treated at home; and (ii) *ws*+severe dengue (inpatients), the combination of dengue with warning signs (*ws*+) and severe dengue groups (*ws*+severe), which were treated at the hospital. The clinical information and platelet levels were retrieved from the patients' charts. Some patients did not have platelet level information available. Volunteers donated blood (40–60 ml) in heparinized vacuum tubes during hospitalization or time-matched

M. H. Gonçalves Pereira *et al.*

control for mild cases (i.e. 6–12 days post-fever onset) and at convalescence (more than 30 days after fever onset). On the same day of collection, plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by centrifugation using Ficoll-Hypaque gradient (SIGMA, San Luis, MI). Plasma samples were stored in  $-80^{\circ}$  freezer. Cells were frozen in fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Campinas, SP, Brazil) in the presence of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; SIGMA) at  $-80^{\circ}$  for 24 hr, and then transferred to liquid nitrogen ( $-196^{\circ}$ ) until use.

#### *Dengue diagnostics, inclusion criteria and secondary infection*

Serological tests for dengue were performed using IgM and IgG PanBio ELISA kit (Inverness Medical Innovations Australia Pty, Brisbane, QLD, Australia) according to the manufacturer's instructions.

RNA from plasma/serum was obtained using PureLink Viral RNA/DNA Kits (INVITROGEN, Carlsbad, CA). Amplifications were performed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX (INVITROGEN) according to manufacturer's instructions in the presence of primers and probes described previously (Table S1).<sup>34</sup> We added 1 U/ $\mu$ l of heparinase when necessary to avoid polymerase-inhibiting properties of heparin.<sup>35</sup>

Individuals were included in this study if positive for dengue infection when IgM at the first 7 days of symptoms or PCR were positive for dengue. Moreover, healthy controls were symptom-free and negative for dengue-specific IgM and IgG. Individuals with positive dengue diagnostic presenting IgG during the first 7 days of symptoms were considered pre-exposed and having secondary infection.

#### *Peptide library*

Peptide libraries containing sequential peptides of 15aa and 5aa offset spanning envelope (ENV) and non-structural protein 3 (NS3) of DENV1 (NP\_059433.1) were purchased from Mimotopes (Melbourne, VIC, Australia). The libraries of DENV1 ENV (NP\_722460.2) and NS3 (NP\_722463) contained 97 and 123 peptides, respectively, and the list of peptides in each library is listed in Table S2. The peptides were reconstituted in DMSO (20 mg/ml) and used at final concentration of 2  $\mu$ g/ml in each assay.

#### *Immunophenotyping and intracellular cytokine assessment*

Peripheral blood mononuclear cells were thawed in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) containing 10% FBS and

20 U/ml benzonase nuclease (Novagen, Madison, WI), washed in phosphate-buffered saline (PBS) and cultured at the concentration of  $1.0 \times 10^6$  cells/well. After a period of ambience of 2 hr in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, the cells were cultured for another 10 hr in four different experimental conditions: (i) absence of stimulus; (ii) stimulation with DENV1 ENV peptide library; (iii) stimulation with DENV1 NS3 peptide library; and (iv) stimulation with anti-CD3 (1.0  $\mu$ g/ml) (BD, Franklin Lakes, NJ) and anti-CD28 (0.5  $\mu$ g/ml) antibodies (BD). Brefeldin A (1.0  $\mu$ g/ml; BioLegend) was added in all culture conditions. After the incubation period, cells were washed in PBS, and stained with Violet Live/Dead (Invitrogen), and with monoclonal antibodies CD3 (Invitrogen), CD4 (BD) and CD8 (Invitrogen). PBMCs were washed, fixed and permeabilized using FoxP3 staining buffer Set (eBioscience, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. Cells were then incubated with antibodies against IFN $\gamma$  (BD), TNF (Invitrogen) and IL10 (eBioscience), washed, resuspended in FACS buffer and acquired on an LSR-FORTESSA (BD).

#### *Analyses of T-cell subpopulations and cytokines production*

Data from cell acquisition were analyzed using Flow Jo X program (LLC, Ashland, OR). The populations of lymphocytes, singlets and time (exclusion of interruptions in the flow) were selected as in Fig. S1. Then, to obtain the intersection of these three initial gates, the Boolean Gate tool 'Make and Gate' was used, resulting in the dot plot from which the live CD3<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup>) population was selected. The subpopulations of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were selected from the ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, and staining of IFN $\gamma$ , TNF and IL10 cytokines were determined within the gate of ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> or ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> cells. Single (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>-</sup>IL10<sup>-</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>IL10<sup>-</sup> and IFN $\gamma$ <sup>-</sup>TNF<sup>-</sup>IL10<sup>+</sup>), double (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>IL10<sup>-</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>-</sup>IL10<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>-</sup>TNF<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>) and triple (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>) cytokine-producing CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-cells were determined with Boolean gating (Make and Gate). Samples with less than 20 000 events on ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> gate were excluded from analysis.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism V6.05 software. The results were analyzed using the statistical tests: Kruskal–Wallis statistical test, Mann–Whitney test and Wilcoxon test as indicated in the figure legends. The differences were considered statistically significant when  $P \leq 0.05$ . The outliers were analyzed using the ROUT ( $Q = 2.0\%$ ) method of GraphPad Prism V6.05 software.

## Results

### Study population

Dengue patients ( $n = 39$ ) were recruited between 2013 and 2015 (before Zika epidemic in Brazil), and were grouped into mild dengue group (patients that were treated at home as outpatients) and *ws+/severe* dengue group (inpatient cases that met WHO and Brazilian Ministry of Health for hospitalization). The blood was collected during the critical phase (period when patients were hospitalized or their time match controls) and at convalescence. Unfortunately, only 25 participants accepted to return for second blood collection. Importantly, all participants were contacted by telephone, and had their outpatient or inpatient treatment confirmed by study personnel. Demographic characteristics and laboratory data available are shown in Table 1. Groups were comparable for age, sex distribution, and the proportion of individuals presenting secondary dengue infection was not significantly different between mild and *ws+/severe* dengue (Table 1). Inpatients (*ws+/severe*) displayed higher frequencies of platelets under  $50\,000/\text{mm}^3$  (up to 43%) and lower platelet nadir level (Table 1). All the patients with PCR positive reaction were infected by DENV1, data that were confirmed by the local health authorities stating that DENV1 was the predominant serotype circulating in Belo Horizonte in the years of sample collection. Four patients with DENV4 infection found in our cohort were not included in this study.

### Mild dengue patients presented higher frequencies of DENV-specific single functional T-cells positive for TNF and IL10, but not IFN $\gamma$ , when compared with *ws+/severe* dengue patients

To evaluate the cytokine production by T-cells during dengue infection, we cultured PBMCs in the presence of ENV or NS3 peptide libraries of DENV1. Because we focused on the production of IFN $\gamma$ , TNF and IL10, we first investigated if the peptide libraries would stimulate single cytokine producers T-cells. We observed that, when considering only these cytokines, the frequencies of single cytokine-producing T-cells by dengue patients rarely were

**Table 1.** Demographics and laboratory characteristics of study population from control, mild dengue (outpatients) and *ws+/severe* (inpatients) groups during seasonal transmission 2013–2015

Characteristics and diagnostic of study population	Control ( $n = 15$ )	Mild dengue ( $n = 22$ )	<i>ws+/severe</i> dengue ( $n = 17$ )
Age <sup>1</sup>	29 (21–42)	36 (13–62)	32 (13–79)
Gender (F)	53% (8/15)	73% (16/22)	65% (11/17)
RT-PCR ( $n$ )	0% (0/15)	68% (15/22)	65% (11/17)
ELISA IgM ( $n$ )	0% (0/15)	77% (17/22)	82% (14/17)
ELISA IgG (> 30 d) ( $n$ )	0% (0/15)	65% (13/20)	80% (4/5)
Secondary infection ( $n$ )	—	73% (16/22)	71% (12/17)
Laboratory characteristics of dengue patient groups			
Erythrocytes ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) <sup>2</sup>		4.8 (4.3–5.4)	4.1 (3.3–5.2)**
Hematocrit (%) <sup>2</sup>		42.7 (35.8–47.4)	37.2 (28.2–51.5)**
Platelet < 50 000/ $\text{mm}^3$ ( $n$ )		0% (0/12)	43% (6/14)** <sup>3</sup>
Lowest platelet count ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) <sup>2</sup>		106.6 (60.0–224.0)	62.6 (16.9–228.0)**

<sup>1</sup>Geometric mean (min–max).

<sup>2</sup>Geometric mean (confidence interval).

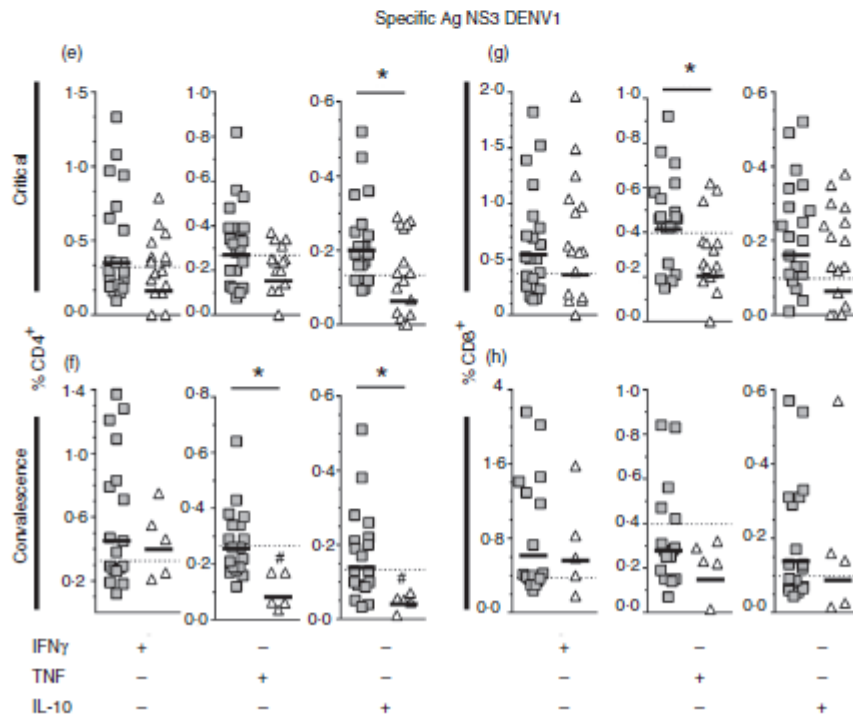
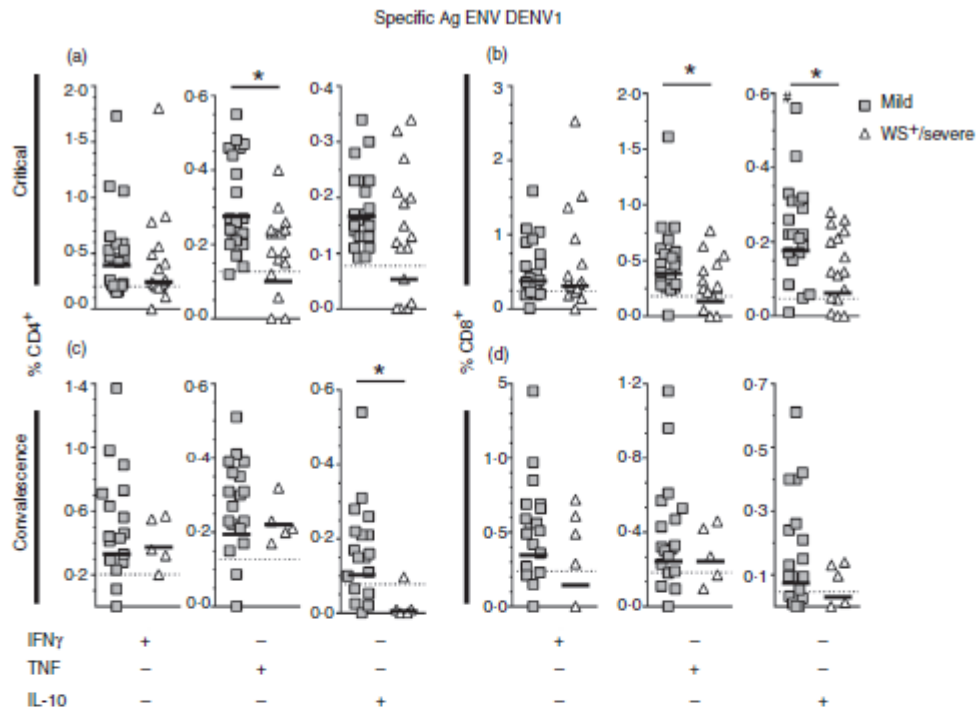
<sup>3</sup>Platelets were not available for all patients as the request of this exam was at attending physician discretion.

\*Fisher test  $P < 0.005$ .

\*\*Mann–Whitney test  $P < 0.002$ ; age: Kruskal–Wallis test  $P > 0.13$ ; gender: Fisher test  $P > 0.5$ .

different from background control levels, indicated by the dashed line (Fig. 1). Only the frequency of ENV-stimulated IL10-producing CD8<sup>+</sup> T-cells during the critical phase was significantly above background (as indicated by the # sign; Fig. 1b). Interestingly, despite poor stimulation of TNF and IL10 single producers CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-cells by ENV or NS3 (Figs S3 and S4), we could observe that patients with *ws+/severe* dengue, when compared with the mild dengue group, presented decreased frequencies of T-cells producing only TNF or IL10 during critical and convalescence phases upon stimulation with peptide

**Figure 1.** Individuals with mild dengue presented more dengue virus (DENV)-specific T-cell single producers of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin (IL)10, but not interferon gamma (IFN $\gamma$ ), than *ws+/severe* dengue subjects. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from DENV-infected patients with mild (dark gray squares) and severe (white triangle) forms were stimulated with peptide libraries for envelope (ENV; a–d) and non-structural protein 3 (NS3; e–h) during critical and convalescence phases of infection. Frequencies of IFN $\gamma$ , TNF or IL10 production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells were evaluated by flow cytometry among CD3<sup>+</sup> live gated cells. The horizontal solid lines represent the geometric mean. Dotted lines represent the geometric mean of the non-infected control group ( $N = 11–15$ ). Differences between DENV-infected groups were analyzed by Mann–Whitney statistical test and are indicated by asterisks (\*) for  $P < 0.05$ . Comparisons between non-infected control and dengue groups were performed by Kruskal–Wallis test, and are indicated by the hash sign (#) for  $P < 0.05$ .  $N$  was 20–22 for mild dengue and 14–16 for *ws+/severe* dengue cases during the critical phase, and 19–20 for mild dengue and 4–5 for *ws+/severe* dengue cases during convalescence.



libraries for ENV (Fig. 1a–c) and NS3 (Fig. 1e,f). In general, CD4<sup>+</sup> T-cells were generally poor single cytokine responders (Figs S2 and S3) upon stimulation with peptide libraries when compared with unstimulated cultures (Fig. S3). Although the frequency of IFN $\gamma$ -producing DENV-specific T-cells was not different between dengue groups (Fig. 1), CD8<sup>+</sup> T-cells from mild dengue at convalescent phase responded to NS3 displaying increased IFN $\gamma$ -positive population after stimulation, while T-cells were refractory in most ws+/severe dengue group (Figs S2 and S4). In contrast, we observed that CD4<sup>+</sup> T-cells of ws+/severe patients group showed decreased IFN $\gamma$  production upon ENV stimulation during the critical phase when compared with unstimulated cultures (Fig. S3). In addition, ENV-specific IL10 and NS3-specific TNF in CD8<sup>+</sup> T-cell compartments were also inhibited by peptide library stimulation in ws+/severe group (Fig. S4).

#### Individuals with mild dengue presented high frequencies of multifunctional T-cells

We evaluated if T-cells were able to produce simultaneously IFN $\gamma$ , TNF and/or IL10 upon stimulation. Multifunctional T-cells producing multiple cytokines emerged in response to both antigens, ENV and NS3, although triple cytokine producers were induced only by NS3 (Figs 2, 3 and S5–S7). These cell populations, i.e. multifunctional DENV-specific T-cells, were more often different from the control non-exposed group (as indicated by the # sign) when compared with single cytokine-producing T-cells.

The mild dengue group presented higher frequencies of DENV-specific T-cell double producers of IFN $\gamma$  and IL10 when compared with controls and the ws+/severe group during critical (ENV- and NS3-specific; Fig. 2a,b,e,f) and convalescence (ENV-specific) phases (Fig. 2c,d). Although not different from uninfected controls, NS3-specific IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells were found more frequently in the mild dengue group when compared with ws+/severe patients (Fig. 2e). We also could observe a consistent population of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells responding to ENV and NS3 during the critical phase in the mild group when compared with ws+/severe patients (Fig. 2b,f), a difference that faded in the convalescence phase. In

addition, despite no difference between the mild dengue and ws+/severe dengue groups, frequencies of ENV-specific IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells were also found to be increased over non-infected controls during critical phase, for mild dengue group (Fig. 2a), and convalescence, for both mild and ws+/severe groups (Fig. 2c). Furthermore, ws+/severe dengue patients showed decreased frequencies of ENV- and NS3-specific T-cell double producers of TNF and IL10 when compared with mild dengue and control subjects during convalescence (Fig. 2c,d,g,h). In addition, NS3-specific, but not ENV-specific, T-cell triple producers of IFN $\gamma$ , TNF and IL10 were found increased in the mild dengue group when compared with controls and ws+/severe dengue at both critical (CD8<sup>+</sup> T-cells; Fig. 3g) and convalescence (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells) phases (Fig. 3f,h). Interestingly, our data indicate that NS3 seems a better stimulator of multifunctional T-cell responses. For example, CD4<sup>+</sup> T-cells were able to respond to NS3 with double and triple multifunctional T-cells, while ENV stimulation could marginally induce these types of responses (Fig. S6).

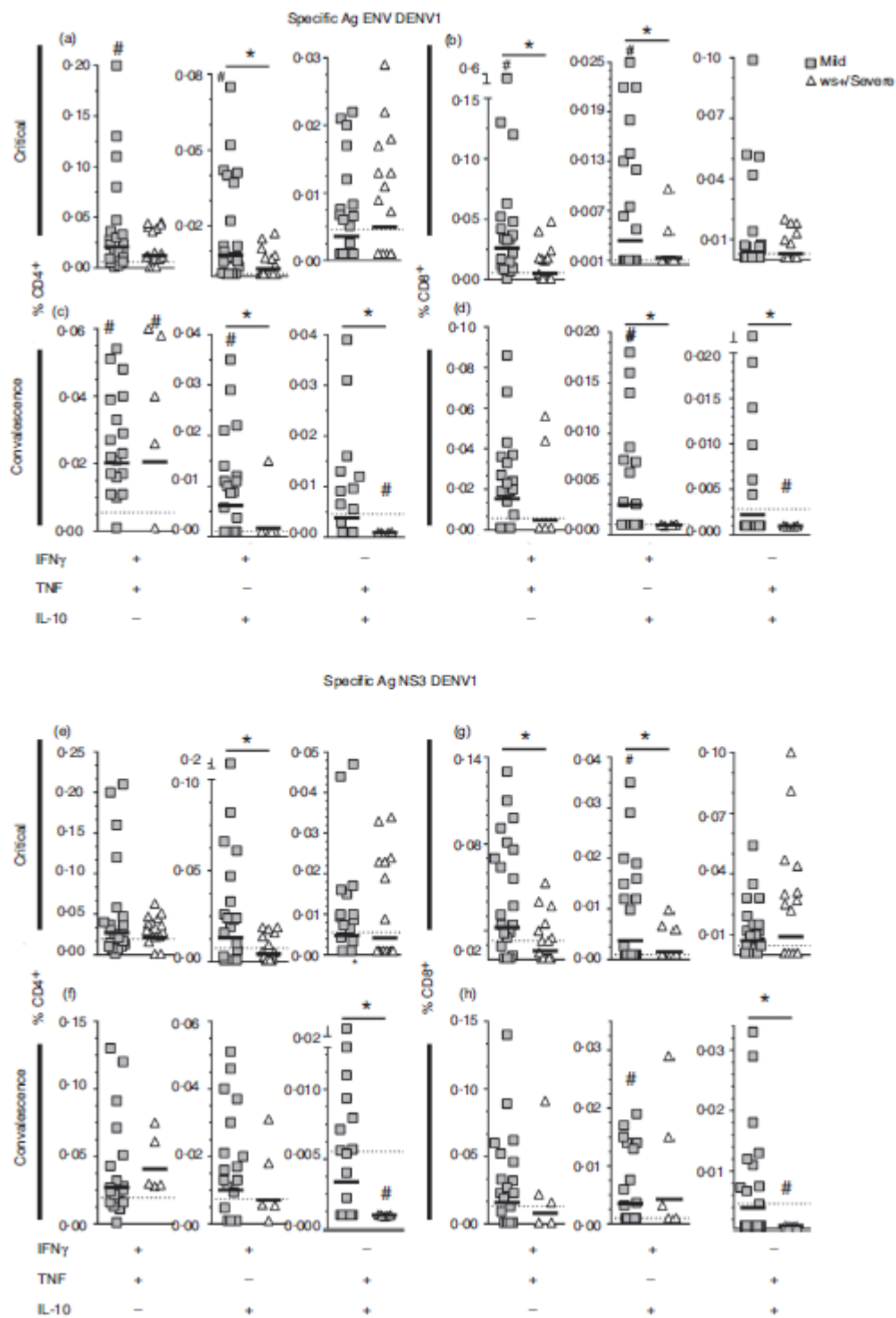
In order to investigate if these multifunctional T-cells were associated with objective clinical evolution parameters, we investigated the correlation between the frequencies of T-cell populations and the lowest levels of platelets measured during the critical phase. Serial platelet measurements during the critical phase were available for most of the inpatients and few outpatients as Brazilian Health Ministry guidelines do not require serial platelet measurement for mild dengue cases. From the available data, we could observe that, during the critical phase, the frequencies of NS3-specific IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> and IFN $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> producer CD8<sup>+</sup> T-cells and triple cytokine producer CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells responding to either ENV or NS3 showed positive correlations with the nadir platelet levels observed (Table 2), suggesting a role of these cell populations in clinical evolution.

#### Multifunctional T-cells produce higher amounts of IFN $\gamma$ , TNF and IL10

To gain insight about the ability of multifunctional T-cells to produce effector cytokines, we compared the mean fluorescence intensity (MFI) of each cytokine in T-

**Figure 2.** Individuals with mild dengue presented higher frequencies of interleukin (IL)10<sup>+</sup> double producer CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from dengue virus (DENV)-infected patients with mild and severe clinical presentations were stimulated with peptide libraries of envelope (ENV; a–d) and non-structural protein 3 (NS3; e–h) during acute (top) and convalescence (bottom) phases of infection. Frequencies of double producer CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells were evaluated by flow cytometry in CD3<sup>+</sup> gated cells. The horizontal lines represent the geometric mean. The dotted lines represent the geometric mean of the non-infected control group ( $N = 10–15$ ). Differences between groups were analyzed by Mann–Whitney statistical test and are indicated by asterisks (\*) for  $P < 0.05$ . Comparisons between non-infected control and dengue groups were performed by Kruskal–Wallis test and are indicated by the hash (#) sign for  $P < 0.05$ .  $N$  was 20–22 for mild dengue and 14–16 for ws+/severe dengue cases during the critical phase, and 19–20 for mild dengue and 4–5 for ws+/severe dengue cases during convalescence.



M. H. Gonçalves Pereira *et al.*

## Multifunctional T-cells in dengue

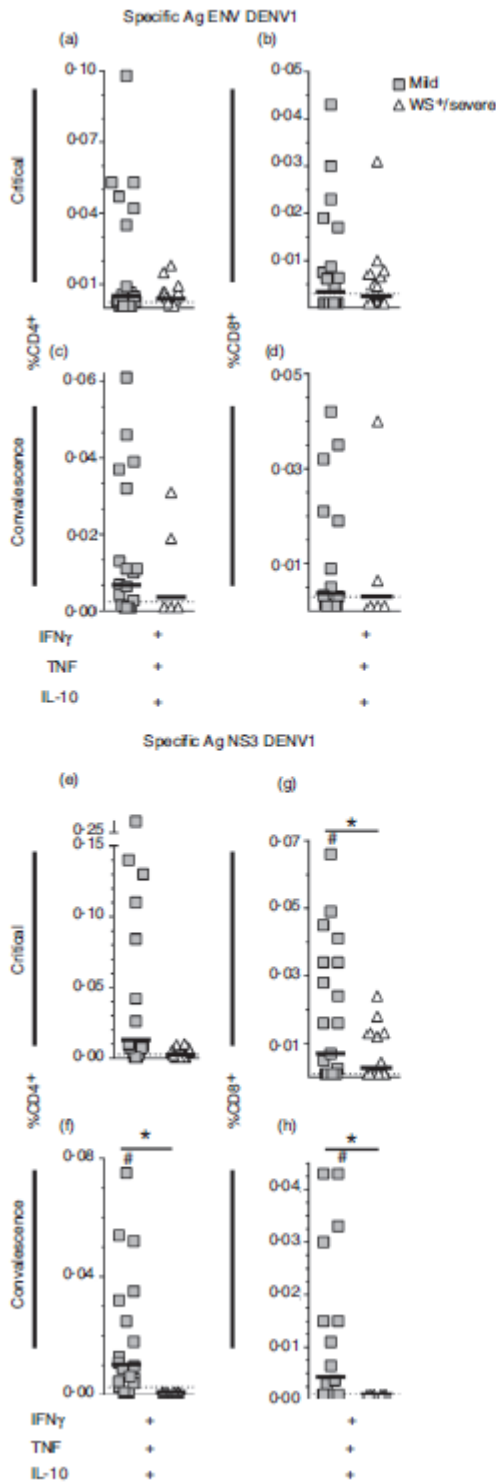


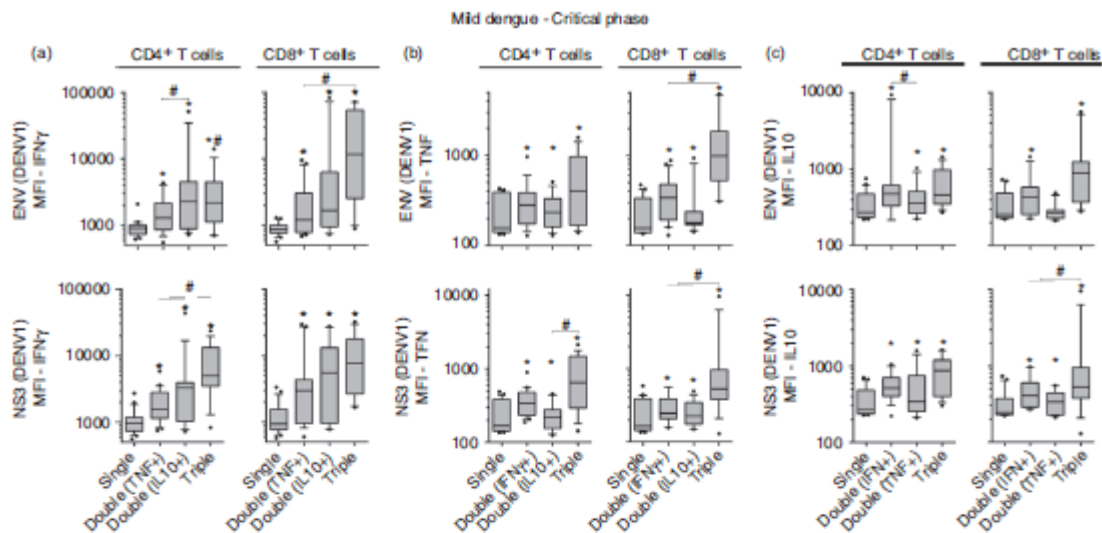
Table 2. Correlation of T-cell frequencies with nadir platelet levels

Cytokine production	Spearman rank $r$ ( $P$ )			
	ENV-specific		NS3-specific	
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
IFN $\gamma$ only	ns	ns	ns	ns
TNF only	ns	ns	ns	ns
IL10 only	ns	ns	ns	ns
IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL10 <sup>+</sup>	ns	ns	ns	0.51 (0.037)
IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup>	ns	0.62 (0.005)	ns	0.58 (0.010)
TNF <sup>+</sup> IL10 <sup>+</sup>	ns	ns	ns	ns
IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup> IL10 <sup>+</sup>	0.47 (0.038)	0.50 (0.029)	0.71 (0.001)	0.53 (0.018)

ns, not significant.

cells producing single or multiple cytokines. Triple producer T-cells often showed the highest MFI of each cytokine when compared with single or double producers (Figs 4 and S8). For example, the MFI of IFN $\gamma$  displayed by ENV-specific IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells was 9739, while IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>-</sup> IL10<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells presented 872.6, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> IL10<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells were 1629, and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>-</sup> IL10<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells presented 2986 (Fig. 4a). Similar results were observed for TNF- and IL10-producing T-cells (Fig. 4b,c, respectively), as well as for production of IFN $\gamma$ , TNF and IL10 by NS3-specific T-cells (Fig. 4a–c). The few multifunctional cells found in the control non-exposed group and in the *ws*<sup>+</sup>/severe dengue group, when detected, were also more efficient in producing cytokines (Fig. S8).

Figure 3. Individuals with mild dengue display higher frequencies of non-structural protein 3 (NS3)-specific triple producer CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from dengue virus (DENV)-infected patients with mild and severe clinical forms were stimulated with peptide libraries of envelope (ENV; a–d) and NS3 (e–h) during critical (top) and convalescence (bottom) phases of infection. Frequencies of interferon gamma (IFN $\gamma$ )/tumor necrosis factor (TNF)/interleukin (IL)10-producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells were evaluated by flow cytometry in CD3<sup>+</sup> gated cells. The horizontal lines represent geometric mean. The dotted lines represent geometric mean of the non-infected control group ( $N = 11–14$ ). Differences between mild dengue and *ws*<sup>+</sup>/severe groups were analyzed by Mann–Whitney statistical test and are indicated by asterisks (\*) for  $P < 0.05$ . Comparisons between non-infected control and dengue groups were performed by Kruskal–Wallis test and are indicated by the hash (#) sign for  $P < 0.05$ .  $N$  was 20–22 for mild dengue and 14–16 for *ws*<sup>+</sup>/severe dengue cases during the critical phase, and 19–20 for mild dengue and 4–5 for *ws*<sup>+</sup>/severe dengue cases during convalescence.



**Figure 4.** Multifunctional T-cells produce more interferon gamma (IFN $\gamma$ ), tumor necrosis factor (TNF) and interleukin (IL)10 than single producer T-cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from mild dengue patients were stimulated with peptide libraries for envelope (ENV; top) and non-structural protein 3 (NS3; bottom) during the acute phase of infection. Mean fluorescence intensity (MFI) of IFN $\gamma$  (a) by single (IFN $\gamma^+$ TNF $^-$ IL10 $^-$ ), double (IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL10 $^-$  and IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL10 $^+$ ), triple (IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL10 $^+$ ) T-cell producers, TNF (b) by single (IFN $\gamma^+$ TNF $^-$ IL10 $^-$ ), double (IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL10 $^-$  and IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL10 $^+$ ), triple (IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL10 $^+$ ) T-cell producers, or IL10 (c) by single (IFN $\gamma^+$ TNF $^-$ IL10 $^-$ ), double (IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL10 $^-$  and IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL10 $^+$ ), triple (IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL10 $^+$ ) T-cell producers cells were evaluated by flow cytometry in CD3 $^+$  CD4 $^+$  and CD3 $^+$  CD8 $^+$  gated cells. Differences between groups were analyzed by Kruskal–Wallis test when comparing single, double and triple producers, and are indicated by asterisks (\*) for  $P < 0.05$ . Analysis included only cytokine-positive T-cell populations, and  $N$  was, respectively, for CD4 $^+$  and CD8 $^+$  T-cells, 21 and 20 for single producers, 18 and 20 double producers, and 13 and 10 for triple producers.

## Discussion

Dengue virus infection resistance is highly associated with a robust and sustained production of IFN $\gamma$ .<sup>36</sup> Although there are few reports analyzing multifunctional T-cells in dengue, IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL2 $^+$ -producing CD4 T-cells seem to be associated with a robust response to live-attenuated dengue vaccine.<sup>30,31,37</sup> In this report, we analyzed the composition and quality of CD4 $^+$  and CD8 $^+$  T-cell responses against DENV during natural infection. We found that T-cells producing only IFN $\gamma$  are present in similar percentages during both mild and severe disease presentations. Strikingly, the most significant differences in T-cell populations between mild dengue and ws+/severe dengue patients were found in the double (IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ , IFN $\gamma^+$ IL10 $^+$  and TNF $^+$ IL10 $^+$ ) and triple (IFN $\gamma^+$ TNF $^+$ IL10 $^+$ ) T-cell producers, which were often increased in individuals developing mild forms of dengue and rarely upregulated in relation to background in the ws+/severe group.

Multifunctional IL10 $^+$ Th1 or IL10 $^+$ Tc1 cells are able to produce sustained and controlled levels of IFN $\gamma$  contributing to host resistance to several infections.<sup>21–26,38</sup> These cells not only contribute to a better effective control of pathogens, but also are able to limit

immunopathology. For example, IFN $\gamma$ /IL10-producing CD8 $^+$  T-cells are absent in mice susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection,<sup>24,25</sup> which develop higher levels of parasitemia and increased pathology. Similarly, IL10 production by Th1 cells was found to display potent effector function against *Taxoplasma gondii*,<sup>23</sup> contributing to parasite control. These cells were also found to contribute to virus control and limit immunopathology in the lungs of mice infected with influenza virus<sup>26</sup> and in the brain of mice infected with coronavirus.<sup>38</sup> Despite low frequencies of these cells during effector immune response, they are considered very important to promote effector mechanisms against infection and to contain hyperinflammation during disease evolution minimizing pathology.<sup>39</sup>

Dengue virus-specific T-cells producing IFN $\gamma$  and TNF can be found in human<sup>9,29–31,37</sup> and experimental<sup>40</sup> dengue infection. Interestingly, IFN $\gamma^+$ TNF $^+$  CD8 $^+$  T-cells were also found to be increased in patients with a history of Hemorrhagic Dengue,<sup>9</sup> suggesting a deleterious role of these cells. On the other hand, this T-cell population was found to be induced by different immunogenic live-attenuated dengue vaccines.<sup>30,31,37</sup> In our cohort, we observed that IFN $\gamma^+$ TNF $^+$  CD8 $^+$  T-cell populations were increased in individuals developing mild dengue infection in

## Multifunctional T-cells in dengue

response to structural (ENV) or non-structural (NS3) proteins when compared with more severe forms of disease. In addition, the frequency (or amount) of CD8<sup>+</sup> T-cells positive for IFN $\gamma$  and TNF, i.e. IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> populations, demonstrated positive correlation with higher platelet levels, suggesting association with resistance to DENV infection. Interestingly, Hatch *et al.*<sup>5</sup> found that higher frequencies of T-cells producing IFN $\gamma$ , TNF or IL2 were associated with asymptomatic dengue infection, but they did not find multifunction in their observation. Possibly, the type of antigen stimulation, peptide library in the present work versus inactivated virus culture, may have had an impact on the ability to detect multifunctional T-cells.

The role of IL10 in dengue infection has been a matter of much debate. While some reports associate IL10 with favorable evolution of infections in general, including dengue,<sup>18,39,41</sup> others find IL10 associated with impaired immune responses in dengue and hemorrhagic manifestations.<sup>16,42–44</sup> We believe that the cell source of IL10 may have important implications in these divergent findings. Most of the evidences linking IL10 to detrimental dengue evolution are from reports that evaluate its levels in plasma during very early phase (mostly febrile period) of infection and, importantly, do not assess the source. On the other hand, most of the evidences linking IL10 to a favorable evolution of infectious diseases evaluate T-cell-derived IL10. In our work, we focused on T-cell-derived IL10, especially when associated with effective immune response against DENV infection.

T-cells producing simultaneously IL10 and IFN $\gamma$  are of especial interest because they have been associated with increased resistance to viral or protozoal infections associated with decreased infection-related pathology.<sup>21–26,38</sup> However, a recent observation of an IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cell DENV-specific subpopulation has found them more frequently in severe dengue cases.<sup>32</sup> Interestingly, we found this DENV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell population increased in mild dengue patients, but this population did not show correlation with platelet levels. In contrast, we also found that mild forms of dengue presented higher frequencies of not only IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells, but also T-cells TNF<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>, especially responding to NS3 antigen, many of which showed positive correlation with platelet levels. Our data show some fluctuations regarding the differences between mild and *ws+/severe* dengue groups according to the time of infection. While some double producer T-cell populations were upregulated in mild forms during the critical phase, others were upregulated in the circulation only during convalescence. These data suggest a dynamic T-cell homeostasis along the infection. Noteworthy, the IFN $\gamma$ , TNF and IL10 triple producer NS3-specific T-cells were observed in our cohort in low frequencies in both groups during the

critical phase, but in higher frequencies, up to seven times, in individuals with mild dengue when compared with individuals with *ws+/severe* dengue. This cell population decreased in the convalescence phase, especially in the *ws+/severe* dengue group. In convalescence, patients with mild dengue presented 17–22 times more triple producer NS3-specific CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-cells, suggesting that mild dengue individuals are able to develop and maintain memory of this cell population.

Interleukin 10 production has been widely reported to control the levels of cytokine production, including IFN $\gamma$ , but few studies have focused on the ability of cytokine production by IL10<sup>+</sup> multifunctional T-cells. On the other hand, it is commonly observed that IFN $\gamma$  and IL10 double producers display MFI in the highest fluorescence spectrum during intracellular staining.<sup>26</sup> We found that double producers are more efficient cytokine producers than simple producers, and triple producers presented the highest level of intracellular cytokine accumulation. That was true even for the background producers in the control group. We speculate that the DENV response in the control group might be associated with some level of cross-reactivity between Yellow Fever vaccine, widely used in Brazil, and DENV epitopes, but additional studies are needed to confirm this hypothesis. Nevertheless, we do not believe that such cross-reactivity may compromise our conclusions, as multifunctional T-cells are regarded as better cytokine producers in other models. For example, others have demonstrated that IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> IL2<sup>+</sup> multifunctional T-cells, although in lower numbers, also produce higher levels of cytokines.<sup>45,46</sup> Recently, the biology of IL2<sup>+</sup> multifunctional T-cells has been thoroughly investigated, and it was found that their lifetime of multiple cytokine production was shorter than the lifetime of single cytokine producers, but the balance between multiple and single producers was very dynamic with interchanging conversion.<sup>47</sup> Similar analysis has not been performed by others for IL10<sup>+</sup> multifunctional T-cells, but these data are coherent with our findings that show a decline in frequencies of multifunctional T-cells from critical to convalescent phases. Interestingly, we did not find major differences in the intracellular accumulation of cytokines when comparing a specific T-cell subpopulation between mild dengue and *ws+/severe* patients. This observation suggests that once differentiated, the biology of multifunctional T-cells may be similar even between different patient groups. The difference between the groups, therefore, seems to be the ability to generate higher frequencies of multifunctional T-cell populations, especially IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells, and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells, which displayed positive correlation with platelets. The mechanisms underlying the difference between mild and *ws+/severe* dengue groups to produce multifunctional T-cells demand further investigation.

M. H. Gonçalves Pereira *et al.*

Our findings that multifunctional T-cells produced more cytokines and were present preferentially in the mild dengue group seems to create tension with the cytokine storm, a high level of cytokine in the blood like TNF, sTNFR, IL2, MIF, IFN $\gamma$ , and other pro-inflammatory cytokines, often observed in individuals with complicated dengue.<sup>10,14,43,48</sup> However, the source of such massive production of cytokine remains elusive. On the other hand, the majority of the data regarding the physiology of T-cells in dengue infection suggest a protective role,<sup>5,7,30,31,49–52</sup> but the innate source of this cytokinemia has been poorly investigated. Some data suggest that mast cells<sup>53–55</sup> and macrophages,<sup>56,57</sup> for example, may contribute to early cytokine production and also to severe dengue presentation. On the other hand, NK cells were found to produce cytokines associated to the cytokine storm, like IFN $\gamma$  but, while some reports show that NK cells might be associated with resistance to DENV infection,<sup>58–60</sup> NKT cells might be associated with disease severity.<sup>61,62</sup> We believe that pathogen-specific lymphocytes, by acting in a specific manner (antigen-presenting cells displaying pathogen antigens or infected non-immune cells), may provide precise and controlled efficacious response to infection. It has been observed that, despite some leakage, most of the cytokines produced by T-cells will be channeled to the immunological synapse and act primarily and preferentially on the target cells.<sup>63,64</sup> Conversely, innate immunity sources of IL10, IFN $\gamma$  or TNF may cause increased collateral damage as their production is not driven by antigen-specific and target cell-oriented mechanisms. We have not investigated innate sources of these cytokines, but we do not discharge a role of cytokines coming from innate cells, especially IL10, in *ws+/severe* dengue, which will demand further investigation to establish.

An important limitation of this study is the reduced number of patients, especially in the *ws+/severe* dengue group in the convalescent phase. However, despite a weakened statistical analysis at this time point, the main findings are still validated by the consistent differences we found from the IFN $\gamma$ /IL10 and IFN $\gamma$ /IL10/TNF double and triple CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell producers during critical or convalescent phases from the mild dengue group when compared with the *ws+/severe* group and also from controls. In addition, the correlations of these populations and platelets indicate a beneficial role of these cells during active dengue infection. Another limitation of this study is that most of our volunteers have a positive history of vaccination for Yellow Fever, which could impact the background levels, especially in the non-infected group, due to possible cross-reactive clones.<sup>65</sup> Importantly, the cells associated with our main findings, DENV-specific IL10<sup>+</sup>Th1 (IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> TNF<sup>±</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells) and especially IL10<sup>+</sup>Tc1 (IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> TNF<sup>±</sup> CD8<sup>+</sup> T-cells), were

statistically increased in mild dengue patients when compared with *ws+/severe* patients and with non-infected controls.

This paper shows that multifunctional T-cells producing IFN $\gamma$ , TNF and IL10 are present during mild forms of dengue disease. We found a strong association between high frequencies of DENV-specific IFN $\gamma$  production by T-cells, especially when combined with TNF and/or IL10, and mild clinical forms of dengue. These data agree with the literature that IFN $\gamma$  is necessary for resistance against DENV infection.<sup>36</sup> Importantly, double (IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> and TNF<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>) and markedly triple (IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>) cytokine producer CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells seem to be important effector players of immune response against DENV as they seem able to produce very high levels of IFN $\gamma$ , TNF and IL10. These results suggest that type 1 pro-inflammatory response associated with a regulatory response provided by IL10, produced by multifunctional T-cells, contributes to an appropriate evolution of dengue infection, possibly balancing effector mechanisms against the virus and preventing pathology.

### Acknowledgements

The authors are grateful to study participants and healthy volunteers for their participation. The authors thank Ana Beatriz Ribeiro de Queiroz, Lorena Junia de Souza Santos, Pedro Augusto Carvalho Costa, Sarah Carvalho Pains, Suelara Fernandes S. Martins and Rafael de Paula Paschoalino for technical assistance. The authors also thank Laíla Sampaio Horta, Michele Faria Ramos and Kênia Cristina Magalhães for their help in recruiting volunteers. MHGP and CQP are graduate students of the Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia from UFMG. HCS, LRVA and KJG are CNPq fellows (PQ).

### Author contributions

Conceived and designed the experiments: HCS, LRVA and MHGP. Performed the experiments: MHGP, MMF and CPQ. Analyzed the data: MHGP, HCS and LRVA. Volunteer recruitment and clinical evaluation: HCS, MHGP, TVB, KJG, ULC, AM and LMOD. Wrote the paper: HCS and MHGP. All authors revised and approved the manuscript.

### Funding

This work was supported by the CNPq, FAPEMIG, INCT-Vacinas, the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ (Flow Cytometry Platform) and Flow Cytometry core facility of the Pharmacy School of UFMG.

## Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

## References

- WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control – New Edition. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2009.
- Thomas L, Najjoulah F, Bozner F, Valentino R, Gossire R, Rouse J et al. Clinical presentation of dengue by serotype and year of epidemic in Martinique. *Am J Trop Med Hyg* 2014; **91**:138–45.
- Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol* 2013; **158**:1448–59.
- Endy TP, Anderson KB, Nisalak A, Yoon IK, Gram S, Rothman AL et al. Determinants of inapparent and asymptomatic dengue infection in a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; **5**:e975.
- Hatch S, Endy TP, Thomas S, Mathew A, Potts J, Pazouk P et al. Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection. *J Infect Dis* 2011; **203**:1282–91.
- Weiskopf D, Angelo MA, de Azavedo EI, Silvey J, Greenbaum JA, Fernando AN et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**:E2046–53.
- Bong Ngono A, Chen HW, Tang WW, Joo Y, King K, Weiskopf D et al. Protective role of cross-reactive CD8 T cells against dengue virus infection. *EBioMedicine* 2016; **13**:284–93.
- Zellweger RM, Eddy WE, Tang WW, Miller R, Shrestha S. CD8<sup>+</sup> T cells prevent antigen-induced antibody-dependent enhancement of dengue disease in mice. *J Immunol* 2014; **193**:4117–24.
- Duangchinda T, Dejarattani W, Vasanawathana S, Limpitkai W, Tanghawonchulakul N, Mahit P et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS5 are associated with DHE. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**:16 922–7.
- Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**:532–43.
- Uso N, Rasmussen TM. Dengue virus and the host innate immune response. *Emerg Microbes Infect* 2018; **7**:167.
- Lahn K, Simmons CP, Moran F, Dung NT, Chau TN, Quyen NT et al. Increased frequencies of CD4<sup>+</sup> CD25(hi) regulatory T cells in acute dengue infection. *J Exp Med* 2007; **204**:979–85.
- Agarwal R, Elshikh EA, Chaturvedi UC, Nagesh R, Mustafa AS. Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. *Int J Exp Pathol* 1999; **80**:143–9.
- Green S, Vaughan DW, Kalayanaraj S, Nimmannitya S, Surtayakorn S, Nisalak A et al. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol* 1999; **99**:329–34.
- Lilley DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajon C, Endy TP, Finis FA. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol* 2001; **75**:3501–8.
- Malaviya GN, Gomes L, Alex I, Chang T, Salimi M, Fernando S et al. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. *BMC Infect Dis* 2013; **13**:341.
- O'Gara A, Vieira PI, Vieira P, Goldfield AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4<sup>+</sup> Tregs limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004; **114**:1372–8.
- Rojas JM, Avia M, Martin V, Sevilla N. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J Immunol Res* 2017; **2017**:6104054.
- Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre F, Rabal N, Alvarez M et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 2010; **71**:1135–40.
- Iani FC, Caldas S, Duarte MM, Gury AI, Cecilio AB, Costa PA et al. Dengue patients with early hemorrhagic manifestations low coordinate expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 with the inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Am J Trop Med Hyg* 2016; **95**:193–200.
- Freitas do Rosario AP, Lamb T, Spence P, Stephens R, Lang A, Rosa A et al. IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4<sup>+</sup> T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. *J Immunol* 2012; **188**:1178–90.
- Jaganathan P, Fikla-James J, Bowen K, Niekys F, Auma A, Wamala S et al. IFN-gamma/IL-10 co-producing cells dominate the CD4 response to malaria in highly exposed children. *PLoS Pathog* 2014; **10**:e1003864.
- Jenkovic D, Kallberg MC, Feng CG, Goldzimid BS, Colizzo CM, Wilson M et al. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 2007; **204**:273–83.
- Roura-Garcia Y, Rosales-Encina JL, Sotolongo AR, Takama-Robana P. IL-10/IFN-gamma double producers CD4<sup>+</sup> T cells are induced by immunization with an attenuated stage-specific derived recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biol Sci* 2011; **7**:1093–100.
- Ruffe E, Rothfuchs AG, Santiago HC, Marino AP, Ribeiro-Gomes FL, Eckhaus M et al. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2012; **188**:649–60.
- Sun J, Madan R, Kap CL, Benciak TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med* 2009; **15**:277–84.
- Anderson CF, Ostka M, Kachroo VJ, Sachs D. CD4(+)CXCR2(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 2007; **204**:285–97.
- Morcin-Tavares L, Redford PS, Stavropoulos E, Ghilardi N, Maynard CL, Weaver CT et al. T cell-derived IL-10 impairs host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2017; **199**:613–23.
- Badolato-Goren J, Sanchez-Arcik JC, de Souza Alves TM, Santa-Barbara J, Corrado Gaerem Naves P, da Rocha Queiroz Lima M et al. Human T cell responses to Dengue and Zika virus infection compared to Dengue/Zika coinfection. *Infect Immun* 2017; **85**:194–206.
- Lindsay JC, Benschhoff-Poole N, Durbin AP, Whitehead SS, Finlaid KA, Burn JY et al. Primary vaccination with low dose live dengue 1 virus generates a proinflammatory, multifunctional T cell response in humans. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; **6**:e1742.
- Weiskopf D, Angelo MA, Bang DJ, Sidney J, Paul S, Peters B et al. The human CD8<sup>+</sup> T cell responses induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine are directed against highly conserved epitopes. *J Virol* 2015; **89**:120–8.
- Tian Y, Seaman G, De-Oliveira-Pinto IM, Matsui J, Herms-de la Mata S, Kim C et al. Molecular signatures of dengue virus-specific IL-10/IFN-gamma co-producing CD4 T cells and their association with Dengue disease. *Cell Rep* 2019; **29**:4482–96 e4.
- Alejo A, Ruiz-Angulo MR, Pontes SM, Fernandez de Marco MDM, Sanchez M, Herms B et al. Chemokines cooperate with TNF to provide protective anti-viral immunity and to enhance inflammation. *Nat Commun* 2018; **9**:1790.
- Hue KD, Tuan TV, Thi HT, Bach CT, Anh HH, Wilk BA et al. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantification of dengue virus RNA in plasma. *J Virol Methods* 2011; **177**:168–73.
- Johnson ML, Navarathne C, Grant-Robles AT, Reynolds LP, Reimer DA. Hepatitis treatment of RNA before quantitative real-time RT-PCR. *Biochemistry* 2005; **35**:1140–4.
- Mathew A, Townsley E, Ernis FA. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. *Future Microbiol* 2014; **9**:411–25.
- Chu H, George SI, Srinivasan DT, Ocasio JR, Pattidar CD. CD8<sup>+</sup> T-cell responses in flavivirus-naïve individuals following immunization with a live-attenuated tetravalent dengue vaccine candidate. *J Infect Dis* 2015; **212**:1618–28.
- Tranlam K, Zhao J, Fleming E, Perlman S. Highly activated cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells express protective IL-10 at the peak of coronavirus-induced encephalitis. *J Immunol* 2011; **186**:5642–52.
- Tinichien G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med* 2007; **204**:239–43.
- Yauch LF, Prattwood TK, May MM, Morar MM, Zellweger RM, Peters B et al. CD4<sup>+</sup> T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *J Immunol* 2010; **185**:5405–16.
- O'Gara A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**:425–8.
- Chanonmaitathid T, Kalayanaraj S, Ubal S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol* 2000; **81**:65–75.
- Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shieh SC, Chen SH, Liu HS et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 2006; **74**:142–7.
- Malaviya GN, Jowardani C, Alla KM, Salimi M, Gomes L, Kamaladoss A et al. Suppression of virus specific immune responses by IL-10 in acute dengue infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; **7**:e2409.
- Barel JC, Apte SH, Groves PL, McCarthy JS, Doonan DL. Polyfunctional and IFN-gamma monofunctional human CD4(+) T cell populations are molecularly distinct. *JCI Insight* 2017; **2**:e00499.
- Davies PA, Patel DT, De Lusa PM, Lindsay RW, Davy DF, Flynn BJ et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against leishmania major. *Nat Med* 2007; **13**:843–50.

- 47 Han Q, Bagheri N, Bradshaw EM, Hafler DA, Lauffenburger DA, Love JC. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**:1607–12.
- 48 Coan S, Vaughn DW, Kalayanamaj S, Nimmanitya S, Santayakorn S, Nisalak A *et al.* Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis* 1998; **179**:755–62.
- 49 de Alwis R, Bangs DJ, Angulo MA, Cerpa C, Fernando A, Sidney J *et al.* Immunodominant dengue virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses are associated with a memory PD-1<sup>+</sup> phenotype. *J Virol* 2016; **90**:4771–9.
- 50 Griffoni A, Angulo MA, Lopez B, O'Rourke PH, Sidney J, Cerpa C *et al.* Global assessment of Dengue virus-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in dengue-endemic areas. *Front Immunol* 2012; **3**:1309.
- 51 Tian Y, Sette A, Weiskopf D. Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells: differentiation, function, and application to dengue virus infection. *Front Immunol* 2016; **7**:531.
- 52 Yausch LE, Zellweger RM, Kotter MF, Qatabuddin A, Sidney J, Peters B *et al.* A protective role for dengue virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2009; **182**:465–73.
- 53 St John AL, Rathore AP, Yap H, Ng ML, Metcalfe DD, Vasudevan SG *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 USA* 2011; **108**:9190–5.
- 54 St John AL, Rathore AP, Raghavan B, Ng ML, Abraham SN. Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase, to dengue virus-induced vascular leakage. *EBio* 2013; **2**:00481.
- 55 Syerina A, Jagaraj CJ, Arnan SA, Sédlářan A, St John AL. Dengue vascular leakage is augmented by mast cell degranulation mediated by immunoglobulin Fcγ2b receptors. *EBio* 2015; **4**.
- 56 Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY *et al.* CLRCSA is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 2008; **453**:72–6.
- 57 Cheng YL, Lin YS, Chen CL, Tsai TT, Tsai CC, Wu YW *et al.* Activation of Nrf2 by the dengue virus causes an increase in CLRCSA, which enhances TNF-α production by mononuclear phagocytes. *Sci Rep* 2016; **6**:32 000.
- 58 Azeredo EI, De Oliveira-Pinto LM, Zagze SM, Cerqueira DI, Nagata RM, Kubeka CE. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol* 2006; **143**:345–56.
- 59 Costa VV, Ye W, Chen Q, Teixeira MM, Pereira P, Osi EE *et al.* Dengue virus-infected dendritic cells, but not monocytes, activate natural killer cells through a contact-dependent mechanism involving adhesion molecules. *mBio* 2017; **8**: e00741-17.
- 60 Laoprasitthachon K, Liberty DH, Endy TP, Nisalak A, Chantavitvat S, Finis FA *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infection: potential involvement in early control of viral replication. *J Infect Dis* 2007; **195**:1108–16.
- 61 Matangkasombut P, Choo-In W, Opatasachai A, Pongchakul P, Tangthawornchaisri N, Vannavathana S *et al.* Invariant NKT cell response to dengue virus infection in humans. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**:e2955.
- 62 Ransawat J, Gumbira R, Maillet I, Marques RE, Ivanov S, Fontaine J *et al.* A detrimental role for invariant natural killer T cells in the pathogenesis of experimental dengue virus infection. *Am J Pathol* 2011; **179**:1872–83.
- 63 Calvo V, Inpaiento M. Imaging polarized secretory traffic at the immune synapse in Ewing T lymphocytes. *Front Immunol* 2018; **9**:584.
- 64 Sanderson NS, Pantel M, Kretzger KM, Brindley NS, Swenlow M, Immunovich N *et al.* Cytotoxic immunological synapses do not restrict the action of interferon-γ to antigenic target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**:7835–40.
- 65 Kumari I, Briston MA, Suman AL, Finis FA. Dengue virus-specific, human CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell clones: multiple patterns of virus cross-reactivity recognized by NS3-specific T-cell clones. *J Virol* 1991; **65**:1823–8.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Cytokine panel gate strategy.

**Figure S2.** Dot plots representative for cytokines production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells in the presence of ENV or NS3 peptide library stimulation.

**Figure S3.** Dengue patients show poor cytokine production by single producers CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in the presence of DENV-specific peptides.

**Figure S4.** Mild dengue patients showed IFN $\gamma$  and IL10 production by DENV-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in convalescence phase.

**Figure S5.** Dot plots representative for double production of cytokines by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells in the presence of ENV or NS3 stimuli.

**Figure S6.** Production of cytokines by polyfunctional DENV-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from mild dengue patients at defervescence phase.

**Figure S7.** Production of cytokines by polyfunctional DENV-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from mild dengue patients at defervescence phase.

**Figure S8.** The multifunctional T-cells produce more cytokines than double and simple producer T-cells.

**Table S1.** Oligo primers and probes.

**Table S2.** Sequence of peptides in each library.