

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

**MARCELA HELENA GONÇALVES PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE CÉLULAS T EM INFECÇÃO HUMANA  
PELO VÍRUS DENGUE COM ÊNFASE EM CÉLULAS T REGULADORAS**

Belo Horizonte  
Fevereiro de 2016

MARCELA HELENA GONÇALVES PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE CÉLULAS T EM INFECÇÃO HUMANA  
PELO VÍRUS DENGUE COM ÊNFASE EM CÉLULAS T REGULADORAS**

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Helton da Costa Santiago

Coorientadora: Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Belo Horizonte  
Fevereiro de 2016

043

Oliveira, Marcela Helena Gonçalves Pereira de.

Avaliação da resposta imune de células T em infecção humana pelo vírus dengue com ênfase em células T reguladoras [manuscrito] / Marcela Helena Gonçalves Pereira de Oliveira. – 2016.

77 f. : il. ; 29,5 cm.

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

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Dengue. 3. Citocinas. 4. 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 DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARCELA HELENA GONÇALVES PEREIRA. Aos dezessete dias do mês de fevereiro de 2016 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Avaliação da resposta imune de células T em infecção humana pelo vírus Dengue com ênfase em células T reguladoras"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: 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: Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Kenneth John Gollob (Núcleo de Ensino e Pesquisa do Instituto Mario Penna), aprovada; Dra. Lis Ribeiro do Vale Antonelli - Co-Orientadora (FIOCRUZ-MG), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. 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, 17 de fevereiro de 2016.

Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)

Dr. Kenneth John Gollob (Núcleo de Ensino e Pesquisa do Instituto Mario Penna - NEP-IMP)

Dra. Lis Ribeiro do Vale Antonelli - Co-Orientadora (FIOCRUZ-MG)

Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG)

10ª Leau Quercia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por um daqueles momentos considerados divisores de águas no percurso de nossas vidas: Ele proporcionou o encontro do professor Helton com a minha ex-chefe do Lab. DEN/FA da FUNED, Jacqueline Iturra, justamente durante a minha última semana de estágio obrigatório, que se tornava um momento de desespero, por não conseguir completar o número total de horas necessárias para me formar como Biomédica, e desesperança, pois o sonho de estudar e pesquisar na UFMG tornava-se cada dia mais distante. Então, agradeço à Jacque por inesperadamente me indicar ao professor Helton.

Ao professor e orientador Helton, por ter muita paciência comigo, me ensinar, estudar artigos comigo, me preparar para o mestrado, por me obrigar a enfrentar meus medos, enfim por toda ajuda. Agradeço por me aceitar no seu Lab, pois a porta que você me abriu faz da minha vida profissional muito feliz e com um gostinho especial de sonho sendo realizado. Muito obrigada por tudo!

À minha co-orientadora Lis, por me instruir durante os complexos procedimentos de bancada, de aquisição, e nas difíceis análises criteriosas da citometria de fluxo. Muito obrigada por me ensinar uma Citometria de Fluxo de excelência!

Ao professor Ricardo Gazzinelli, por disponibilizar seus laboratórios para a realização prática deste trabalho, bem como à Eneida e à Clécia pela organização dos Labs.

À Maria Marta por ser meu braço direito na Fiocruz, e me auxiliar na execução de todos os experimentos de CBA e Citometria de Fluxo, sua ajuda foi indispensável para mim. Muito obrigada! E a todos do LAIM, especialmente a Suelen, o Pedro e o Bruno Galvão.

À 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.

À minha amiga Gabi por ser meu braço direito no Lab IMPAR, por seu apoio na manutenção das culturas de células, na realização dos ELISA e qRT-PCR, no processamento de amostras, e também no recrutamento de pacientes, etapa nada fácil, mas que ela fez parecer. Muito obrigada!

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 à 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 estudo.

Aos médicos e funcionários dos Hospitais da Santa Casa, João Paulo II, Santo Ivo, e do Centro de Saúde Jardim Montanhês, a Tércia, a Lilian, ao Último, e Érica.

Ao pessoal do Lab. IMPAR, à Ester por esclarecer minhas infinitas dúvidas, mas principalmente por ser tão carinhosa, atenciosa e por me acalmar. À Camila, uma grande amiga e companheira, por me ajudar nas apresentações orais, no último experimento gigante de citometria, por revisar este trabalho, por estar sempre disponível e pronta para colaborar. Agradeço também as meninas de IC, a Lorraine, a Maria, a Janaína, que começou trabalhando com dengue e depois ganhou merecidamente seu próprio projeto, a Amanda, que também contribuiu com a dengue, a Magda, a Naysa, que nos ajuda atualmente com os experimentos da dengue, a Neide e a Sara.

Agradeço também o Glauco da FUNED, por nos doar os vírus dengue isolados de humanos, e a Lucélia, que me ajudou nos primeiros passos do projeto com as primeiras coletas, na cultura de C<sub>6</sub>36 e com o aumento da titulação viral. Aos alunos de IC que também ajudaram em etapas iniciais do trabalho: a Taísa, a Daianny, a Suemara, o Rafael e a Tainara.

Ao professor Flávio da Fonseca, por nos orientar durante a padronização da titulação viral, bem como à Tânia e à 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 Ricardo Fujiwara e Stefan por nos emprestar 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.

Agradeço ao meu amado marido, Alex, por me amar muito todos os dias, cuidar de mim, por caminhar sempre ao meu lado, me ajudando a conquistar os picos mais difíceis com muito amor e alegria, e por construir ao meu lado uma família com muito amor! Te amo!

Aos meus pais, Hélio e Rosa, por todo amor dado a mim desde o meu nascimento, por estarem sempre presentes e apoiando minhas escolhas. Agradeço ao meu irmão, Juninho, por completar nossa família com seu enorme coração e à Andreza minha linda cunhada e amiga.

Agradeço aos familiares e amigos que estão sempre presente com muita alegria e carinho.

Aos professores Ana Caetano, Kenneth Gollob e Andréa Teixeira por aceitarem participar da banca.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia.

Ao CNPQ e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A dengue é uma doença viral aguda causada por quatro sorotipos diferentes (DENV1, DENV2, DENV3 ou DENV4) e muito presente em países tropicais e subtropicais. A doença pode ser classificada como dengue sem sinais de alarme (DSA), dengue com sinais de alarme (DCA) e dengue grave (DG), que pode ser fatal. Especula-se que o processo inflamatório exacerbado seja o responsável pela ocorrência da DG, porém pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam o processo inflamatório em infecções por dengue. As células T reguladoras (Tregs) são importantes reguladoras da resposta inflamatória através da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, ou por inibição direta das células efetoras através de seus receptores como CD200, LAP, GITR, PD-1, entre outros. O estudo de mecanismos de regulação mediada por Tregs pode fornecer informações sobre como o hospedeiro controla a inflamação em uma infecção aguda prevenindo complicações. A fim de avaliar o perfil de resposta imunológica, as PBMC foram isoladas de amostras de sangue de indivíduos saudáveis e infectados com vírus dengue e mantidas congeladas a  $-196^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. Após descongelamento, as células foram cultivadas com estímulos antigênicos e submetidas à citometria de fluxo multi-paramétrica. Observou-se que os indivíduos DSA mostraram um aumento significativo na produção de citocinas inflamatórias como  $\text{IFN}\gamma$  e  $\text{TNF}\alpha$ , oriundos de células T específicas de dengue, 7 dias após o início dos sintomas. Além disso, as células T de pacientes DSA exibiram produção de IL-10 específica ao dengue 30 dias após o início dos sintomas, em contraste com os sujeitos DCA. Apesar de não haver diferença na frequência das Tregs ( $\text{CD4}^+ \text{CD25}^{\text{high}} \text{CD127}^{\text{low}} \text{FoxP3}^+$ ), foram observadas entre as classificações de dengue, que as células Tregs de pacientes DSA expressam frequências mais elevadas de CD200 e GITR quando comparado ao grupo DCA. Muito importante, a população de Tregs específica à dengue produzindo níveis elevados de IL-10 foi detectada em indivíduos DSA, mas não em indivíduos DCA. Outras moléculas reguladoras, como PD-1 e LAP, não foram diferentes entre os grupos. Indivíduos DSA durante a defervescência exibiram maior produção de  $\text{IFN}\gamma$  e  $\text{TNF}\alpha$  por células T específicas ao dengue quando comparados aos pacientes DCA. Além disso, a resposta pró-inflamatória específica do dengue foi associada com mecanismos de regulação (IL-10, CD200 e GITR), sugerindo que a resposta imune equilibrada é importante para a evolução clínica da dengue favorável.

Palavras-chave: Dengue, Tempestade de Citocinas e Células Tregs.

## ABSTRACT

Dengue is a viral acute disease caused by four different serotypes (DENV1, DENV2, DENV3 or DENV4) and very present on tropical and subtropical countries. The disease can be classified as dengue without warning signs (DWS-), dengue with warning signs (DWS+) and severe dengue (SD), which can be fatal. It is speculated that exacerbated inflammatory process underlies SD, however little is known about the mechanisms that regulates inflammatory process in dengue infection. Regulatory T cells (Tregs) are major regulators of inflammatory responses through secretion of anti-inflammatory cytokines, like IL-10, or by direct inhibition of effector cells through receptors like CD200, LAP, GITR, PD-1, among others. The study of regulatory mechanisms mediated by Tregs can provide insight about how the host controls acute infection inflammation preventing complications. In order to evaluate immunological response profile, PBMCs were isolated from blood samples from healthy and dengue-infected subjects and kept frozen at  $-196^{\circ}\text{C}$  until use. After thawing, cells were cultured with antigenic stimuli and subjected to multi-parametric flow cytometry. We observed that DWS- individuals showed significant increase in the production inflammatory cytokines like,  $\text{IFN}\gamma$  and  $\text{TNF}\alpha$ , from dengue-specific T cells as early as 7 days post-fever (PF). In addition, T cells from DWS- patients displayed dengue-specific production of IL-10 at 30 days PF, in contrast to DWS+ subjects. Despite no differences in frequency of Tregs ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low}}\text{FoxP3}^+$ ) observed between dengue classifications, Tregs cells from DWS- patients expressed higher frequencies of CD200 and GITR when compared to DWS+ group. Importantly, a population of dengue-specific Tregs producing high levels of IL-10 was detected in DWS- subjects, but not in DWS+ individuals. Other regulatory molecules, like PD-1 and LAP, were not different between groups. DWS- individuals displayed earlier dengue-specific T cell production of  $\text{IFN}\gamma$  and TNF than DWS+ patients. In addition, dengue-specific pro-inflammatory response was associated with regulatory mechanisms (IL-10, CD200 and GITR), suggesting that balanced immune response is important for a favorable clinical evolution of dengue.

Keywords: Dengue, Cytokine Storm and Treg cells.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Mapa de distribuição da dengue no mundo .....	14
<b>Figura 2</b> – Estrutura e replicação do vírus dengue.....	17
<b>Figura 3</b> – Localização dos epítomos reconhecidos pelas células T.....	19
<b>Figura 4</b> – Aumento Dependente de Anticorpos (ADE).....	21
<b>Figura 5</b> – A intensidade do sinal do TCR instrui o destino dos timócitos CD4 <sup>+</sup> e a diferenciação de células Tregs.....	25
<b>Figura 6</b> – Especialização funcional das células Tregs em distintas classes de resposta imune .....	26
<b>Figura 7</b> – Classificação Clínica da Dengue.....	31
<b>Figura 8</b> – Estratégia de Gate do Painel de Citocinas .....	38
<b>Figura 9</b> – Estratégia de Gate do Painel de Treg .....	39
<b>Figura 10</b> – Indivíduos com DCA desenvolvem uma resposta sistêmica inflamatória escassa .....	41
<b>Figura 11</b> – Indivíduos com DCA desenvolvem uma resposta sistêmica inflamatória fraca associada a altos níveis plasmáticos de IL-10 .....	43
<b>Figura 12</b> – Produção de IL-2 por linfócitos T .....	45
<b>Figura 13</b> – A infecção por dengue não induziu produção relevante de IL-4/IL-13 por linfócitos T específicos ao DENV1.....	46
<b>Figura 14</b> – A infecção por dengue não induziu produção relevante de IL-17A por linfócitos T específicos ao DENV1 .....	47
<b>Figura 15</b> – Os pacientes DSA apresentaram produção de TNF $\alpha$ por linfócitos T específicos ao DENV1 .....	49
<b>Figura 16</b> – Os indivíduos DSA apresentaram produção de IFN $\gamma$ por linfócitos T específicos ao DENV1 .....	50
<b>Figura 17</b> – Os indivíduos DSA apresentaram elevada produção de IL-10 por linfócitos T específicos ao DENV1 .....	52
<b>Figura 18</b> – Os indivíduos DSA apresentaram elevada frequência de células Tregs expressando CD200 e GITR.....	53
<b>Figura 19</b> – As células Tregs provenientes dos indivíduos DSA estão produzindo IL-10 especificamente contra o DENV1.....	54
<b>Figura 20</b> – Nova hipótese para explicar a origem da patogênese em Dengue .....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Oligo Iniciadores (Primers) e Sondas .....	33
--	----

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO A</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	65
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>a.a.</b>	Aminoácido
<b>AD</b>	<i>Annus Domini</i>
<b>ADE</b>	<i>Antibody Dependent Enhancement</i> (Aumento Dependente de Anticorpos)
<b>ALT</b>	Alanina Aminotransferase
<b>APC</b>	<i>Antigen-Presenting Cell</i> (Células Apresentadoras de Antígenos)
<b>AST</b>	Aspartato Aminotransferase
<b>Bcl6</b>	<i>B-Cell Lymphoma 6 Protein</i> (Proteína 6 Linfoma de Célula B)
<b>BHK</b>	<i>Baby Hamster Kidney</i> (Rim de Filhote de Hamster)
<b>Blimp-1</b>	<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i> (Proteína 1 de Maturação Induzida por Linfócitos B)
<b>C</b>	Capsídeo
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array</i> (Ensaio de Citometria de Bead)
<b>CCL</b>	<i>Chemokine (C-C Motif) Ligand</i> (Ligante de Citocina)
<b>CD</b>	Cluster de Diferenciação
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>CPqRR</b>	Centro de Pesquisa René Rachou
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i> (Proteína 4 Citotóxica Associada ao Linfócito T)
<b>CXCL</b>	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand</i> (Ligante de Quimiocina)
<b>DCA</b>	Dengue Com Sinais de Alarme
<b>DENV</b>	<i>Dengue Virus</i> (Vírus da Dengue)
<b>DG</b>	Dengue Grave
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)
<b>DMSO</b>	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> (Dimetil Sulfóxido)
<b>DNA</b>	Ácido Desoxiribonucléico
<b>DSA</b>	Dengue Sem Sinais de Alarme
<b>E</b>	Envelope
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)

<b>Epr</b>	Envelope
<b>F</b>	<i>Foward</i> (Para Frente)
<b>FHD</b>	Febre Hemorrágica da Dengue
<b>FoxP3</b>	<i>Forkhead Box P3</i> (Arquivo da Forquilha P3)
<b>FSC-A</b>	<i>Forward Scatter Area</i> (Área da Dispersão Frontal)
<b>FSC-H</b>	<i>Forward Scatter Height</i> (Altura da Dispersão Frontal)
<b>GITR</b>	<i>Glucocorticoid-Induced TNFR Family Related Gene</i> (Gene Relacionado a Família TNFR Induzido por Glicocorticoide)
<b>HCV</b>	Vírus de Hepatite C
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HSV</b>	Vírus Herpes Simples
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IRF4</b>	<i>Interferon Regulatory Factor 4</i> (Fator Regulatório 4 de Interferon)
<b>LAP</b>	<i>Latency-Associated Peptide</i> (Peptídeo Associado a Latência)
<b>M</b>	Membrana
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> (Proteína 1 Quimioatraente de Monócitos)
<b>MDA5</b>	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i> (Proteína 5 Associada a Diferenciação do Melanoma)
<b>medLN</b>	Linfonodos do Mediastino
<b>MFI</b>	Intensidade Média de Fluorescência
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MHC</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i> (Matador Natural)
<b>NS</b>	<i>Non Strutral</i> (Não Estrutural)
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan Americana de Saúde
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (Células Mononucleares do Sangue Periférico)

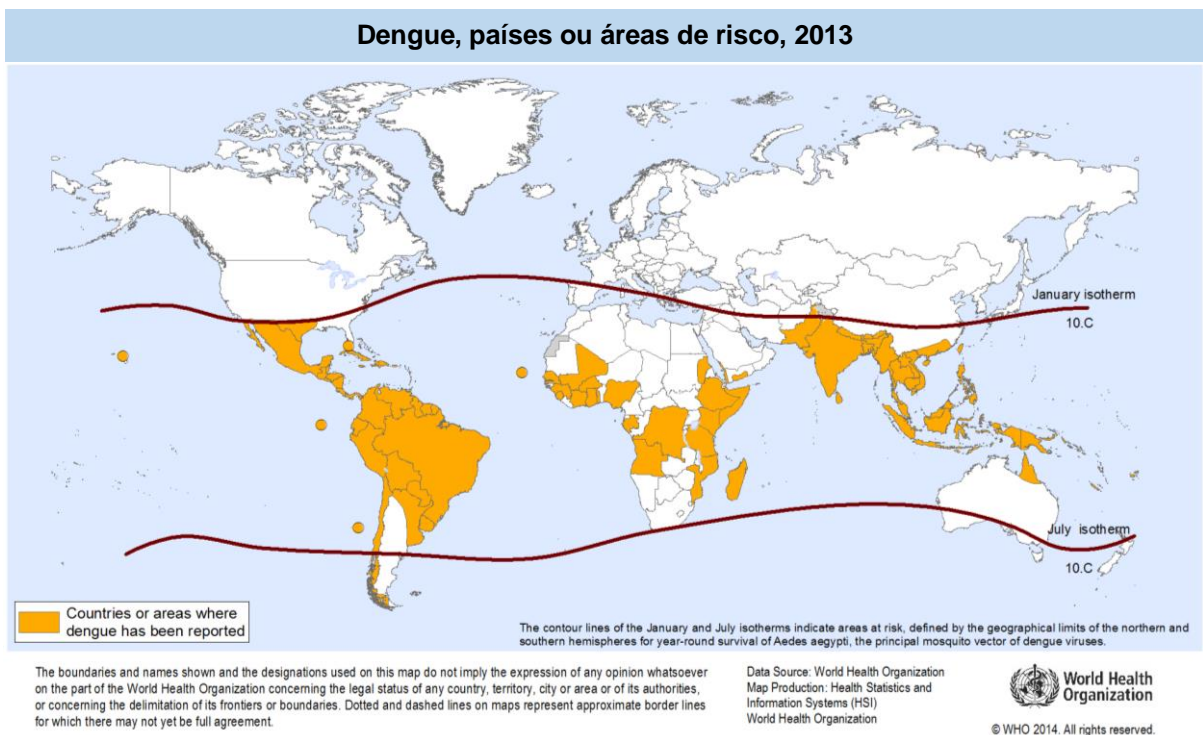
<b>PD-1</b>	<i>Programmed Cell Death-1</i> (Programação de Morte Celular 1)
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>pM</b>	pré-Membrana
<b>qRT-PCR</b>	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Quatitative</i> (Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)
<b>R</b>	<i>Reverse</i> (Inverso)
<b>RE</b>	Retículo Endoplasmático
<b>RIG-I</b>	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene 1</i> (Ácido Retinóico Induzível do Gene 1)
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Instituto Memorial do Park Roswell)
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SSC-A</b>	<i>Side Scatter Area</i> (Dispersão Lateral Área)
<b>Stat</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> (Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição)
<b>Tbet</b>	<i>T-box expressed in T cells</i> (Expressão do Arquivo T em Células T)
<b>TCR</b>	<i>T Cell Receptors</i> (Receptor de Células T)
<b>TDR</b>	<i>Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases</i> (Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais)
<b>TGFβ</b>	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Fator de Transformação do Crescimento Beta)
<b>TGN</b>	<i>Trans-Golgi Network</i> (Rede Trans-Golgi)
<b>Th1</b>	<i>T Helper</i> (T auxiliar)
<b>TLR</b>	<i>Toll-Like Receptor</i> (Receptor Tipo Toll)
<b>TNF</b>	Factor de Necrose Tumoral
<b>Tr1</b>	<i>Type 1 Regulatory T Cells</i> (Células T Tipo 1 Regulatória)
<b>Tregs</b>	T Reguladoras
<b>US</b>	<i>United States</i> (Estados Unidos)
<b>ViViD</b>	<i>LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
<b>WNV</b>	<i>West Nile Virus</i> (Vírus do Nilo Ocidental)
<b>µg</b>	Microgramas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	29
3.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	29
3.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 <i>Recrutamento de Pacientes</i> .....	30
4.2 <i>Classificação Clínica da Dengue</i> .....	30
4.3 <i>Processamento de Amostras</i> .....	31
4.4 <i>Diagnósticos clínicos e sorológico</i> .....	32
4.5 <i>Cultura de Células e Vírus</i> .....	32
4.6 <i>Diagnóstico molecular</i> .....	33
4.7 <i>Biblioteca de Peptídeos</i> .....	34
4.8 <i>Citometria de fluxo</i> .....	34
4.8.1 <i>Cultura de Células</i> .....	34
4.8.2 <i>Painel de Citocinas</i> .....	35
4.8.3 <i>Painel de Células T regulatória</i> .....	35
4.8.4 <i>Análises</i> .....	36
4.9 <i>Análises Estatística</i> .....	37
<b>5. RESULTADOS</b> .....	40
5.1 <i>Indivíduos com DCA desenvolvem uma resposta sistêmica inflamatória escassa associada a altos níveis plasmáticos de IL-10</i> .....	40
5.2 <i>Indivíduos do grupo DSA apresentaram produção de citocinas de perfil Th1 por linfócitos T específicos ao DENV</i> .....	44
5.3 <i>Indivíduos com DSA apresentaram elevada produção de IL-10 por linfócitos T específicos ao DENV1</i> .....	51
5.4 <i>Indivíduos com DSA apresentaram elevada frequência de células Tregs produzindo IL-10 e expressando CD200 e GITR</i> .....	53
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>Anexo A</b> .....	73

## 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). Suspeita-se da sua ocorrência desde tempos muito antigos: há relatos de uma doença com sintomas compatíveis aos da dengue registrados em uma enciclopédia médica chinesa publicada em séculos anteriores ao da Dinastia Chinesa (265-420 AD) (Murray, Quam e Wilder-Smith, 2013). 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 (Brasil, 2011; Simmons, 2012).



**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).

A ampla extensão acometida pelas infecções de dengue causam impactos econômicos a essas regiões devido 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 a dengue moderada levou os pacientes a ficarem média 14,8 dias nos ambulatórios e 18,9 dias hospitalizados. 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. Além disso, foi estimado que o custo anual decorrente da dengue para estes 8 países foi de US \$587 milhões (variando: US \$448 a US \$768 milhões), sendo que 89% deste valor é atribuído a morbidade e 11% a mortalidade. O Brasil foi responsável por 94% dos custos das Américas (Suaya, Shepard, Siqueira, *et al.*, 2009).

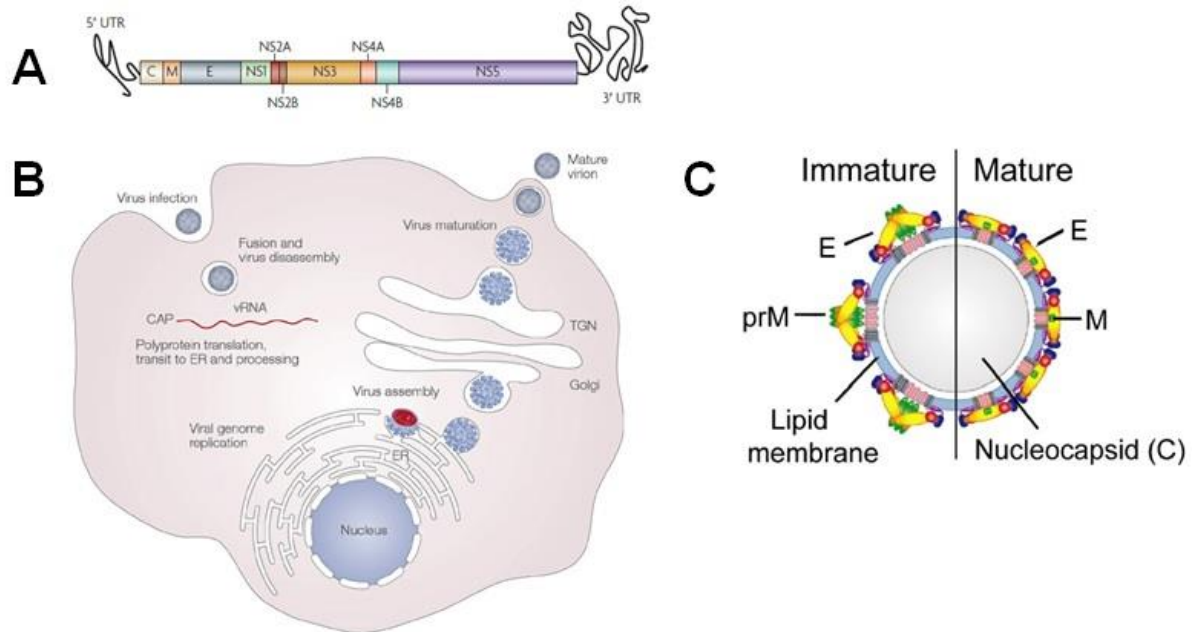
Outro trabalho acerca dos custos financeiros causado pela dengue foi desenvolvido durante o ano de 2010 em Dourados, no estado de Mato Grosso do Sul no Brasil, envolvendo 8.226 casos suspeitos de dengue, sendo que 56,8% destes foram casos confirmados e 507 pacientes foram hospitalizados. Este trabalho demonstrou que o gasto global com os casos com hospitalizações em Dourados chegou à US \$210.084,30, que correspondeu a 2,5% do produto interno bruto daquele ano, e pacientes que necessitaram de algum tipo de produto derivado do sangue, como transfusão de plaquetas, tiveram um custo aproximadamente 3 vezes maior que os casos que não precisaram (Vieira Machado, Estevan, Sales, *et al.*, 2014). As pesquisas 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).

O clima brasileiro apresenta altas temperaturas, umidade e variações sazonais das chuvas, que proporcionam condições ideais para o crescimento e sobrevivência do mosquito. Após os anos 80, a incidência da dengue vem aumentando; assim, em 1999 foram 204.000 casos relatados. Em 2000 a dengue foi relatada em 22 dos 27 estados brasileiros e o mosquito estava presente em todos os estados (Teixeira, Costa, Barreto, *et al.*, 2009). Durante o período de 2000-2010, a incidência da dengue no Brasil variou substancialmente, com três epidemias nacionais nos anos de 2002, 2008 e 2010. Em 2002, o número de prováveis casos de dengue foi de 684.527 a 794.219, em 2008 foi de 637.663 a 806.036 e em 2010 mais de 1 milhão de casos (538/100.000 habitantes), sendo o menor número (72.000 casos) relatado em 2004 (Teixeira, Siqueira, Ferreira, *et al.*, 2013). Na última década (2000-2010), 8.440.253 casos

foram reportados com elevado número de casos graves 221.043 e fatais 3.058 (Teixeira, Siqueira, Ferreira, *et al.*, 2013).

Os vírus da dengue são retrovírus, constituídos de uma fita simples de RNA positivo, membros da família *Flaviviridae*, denominados de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, todos circulantes no Brasil. Em 1986, o DENV1 foi reintroduzido no Rio de Janeiro, desde seu último surto em 1923 (Schatzmayer, Nogueira e Travassos da Rosa, 1986), resultando na expansão subsequente de infecções pelos vírus dengue (DENV) e suscitando 60.000 casos relatados em 1987 (Teixeira *et al.*, 2013). Os vírus isolados de 2000-2008 mostraram que DENV1 foi predominante no início da década, já DENV3 tornou-se predominante a partir de 2003 e DENV2 em 2007 (Teixeira *et al.*, 2013). O sorotipo DENV4 ficou restrito à cidade de Boa Vista (Roraima) por 28 anos, porém no ano de 2008 o estado do Amazonas relatou o primeiro caso de DENV4, e em seguida reemergiu em Boa Vista em julho de 2010 (Temporao, Penna, Carmo, *et al.*, 2011).

A identidade gênica da sequência primária dos quatro sorotipos é de 65-70% (Guzman, Halstead, Artsob, *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 e Ennis, 2014). A infecção pelo vírus acontece através da interação da proteína estrutural viral, envelope (E), com os receptores de membrana presente nas células alvo (Beltramello, Williams, Simmons, *et al.*, 2010; Duangchinda, Dejnirattisai, Vasanawathana, *et al.*, 2010). Os vírus são endocitados e se fundem com o endossomo e a diminuição do pH leva à dissociação do capsídeo (C), liberando o material genético no citoplasma. O genoma é traduzido em uma única poliproteína que é dirigida ao Retículo Endoplasmático (RE) onde será clivada por proteases do hospedeiro que darão origem às três proteínas estruturais: E, C e pré-Membrana (pM), e a sete proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 (Fig. 2 A), que auxiliam na montagem do vírus (Bartenschlager e Miller, 2008; Fischl e Bartenschlager, 2011). Os vírus imaturos contendo a pM e E, presentes no lúmen do RE, seguem para o Complexo de Golgi, onde a pM é clivada, tornando os vírus infecciosos e maduros (Fig. 2 B e C) (Mukhopadhyay, Kuhn e Rossmann, 2005; Murphy e Whitehead, 2011; Jain, Chaturvedi e Jain, 2014).



**Figura 2 – Estrutura e replicação do vírus dengue.** (A) Representação do genoma do vírus dengue que codifica as 3 proteínas estruturais E, C, pM e M, e 7 proteínas não estruturais NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5. Fonte: (Guzman *et al.*, 2010). (B) Ciclo de vida do vírus dengue, TGN (trans-Golgi network). Fonte: (Mukhopadhyay, Kuhn e Rossmann, 2005). (C) Representação estrutural de um vírus imaturo e maduro. Fonte: (Fritz, Stiasny e Heinz, 2008).

Em 2012, a WHO classificou a dengue como a mais importante doença viral transmitida por mosquito do mundo. 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*. Estes vetores podem introduzir qualquer um dos quatro sorotipos virais no hospedeiro (Weiskopf e 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). Uma alternativa é a liberação de mosquitos machos, geneticamente modificados, que gerarão fêmeas incapazes de voar, e assim a nova população de fêmeas não poderia se acasalar, procurar hospedeiros ou evitar predadores, levando então à eliminação do vetor da dengue (Wise de Valdez, Nimmo, Betz, *et al.*, 2011). Outra estratégia é a inserção embrionária no *Aedes aegypti*

de cepas da bactéria intracelular *Wolbachia*. A presença desta deixa os mosquitos parcialmente resistentes à infecção pelo vírus dengue (Moreira, Iturbe-Ormaetxe, Jeffery, *et al.*, 2009; Walker, Johnson, Moreira, *et al.*, 2011). Além disso, uma alternativa eficiente seria a criação de uma vacina, porém apesar das extensas pesquisas na área, ainda não se tem uma vacina amplamente aceita. Dados da vacina desenvolvida pela SANOFI-PASTEUR, que foi recentemente liberada para comercialização no Brasil e no México, apresentam proteção estimada de 60,8% aos quatro sorotipos virais, e o nível de proteção varia entre os sorotipos (DENV1 50,3%, DENV2 42,3%, DENV3 74,0% e DENV4 77,7%). Nota-se que a eficácia é alta para DENV4 e fraca para DENV2. Mas houve uma redução direta na sintomatologia da dengue, e a vacina apresentou elevada eficácia contra dengue grave e hospitalizações. Outros dados interessantes são que o contato prévio com vírus da dengue e a idade estariam contribuindo para o desempenho da vacina. Também, para indivíduos soronegativos a eficácia da vacina foi de 52,5%, já para soropositivos foi de 81,9% (Guy, Briand, Lang, *et al.*, 2015).

A grande maioria dos casos de dengue são assintomáticos ou subclínicos, ou seja, os indivíduos infectados não apresentam sintomas aparentes. Em 2010 estimou-se que cerca de 294 milhões dos casos daquele ano de trabalho eram assintomáticos, enquanto que 96 milhões eram sintomáticos, ou seja, um número cerca de 3 vezes menor (Bhatt, Gething, Brady, *et al.*, 2013). A dengue pode ser classificada, a partir das manifestações clínicas e laboratoriais, em Dengue Sem Sinais de Alarme (DSA), Dengue Com Sinais de Alarme (DCA) e Dengue Grave (DG). A DSA, antes conhecida como dengue clássica, é caracterizada principalmente por febre aguda que dura de 3-7 dias, e pode estar acompanhada de sinais e sintomas inespecíficos tais como cefaleia, mialgia, artralgia, anorexia, náuseas, exantemas, leucopenia e prova do laço positivo, mas que na grande maioria das vezes se resolve sem complicações (Brasil, 2011). A febre acompanhada de pelo menos 2 dos sintomas de alarme, como dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, caracteriza a DCA. É notável que alguns indivíduos DSA, ou mais frequentemente DCA, possam evoluir para o quadro clínico de DG, antes classificada com febre hemorrágica da dengue (FHD), que apresenta extravasamento plasmático grave, sangramento grave e/ou comprometimento severo dos órgãos (Brasil, 2011).

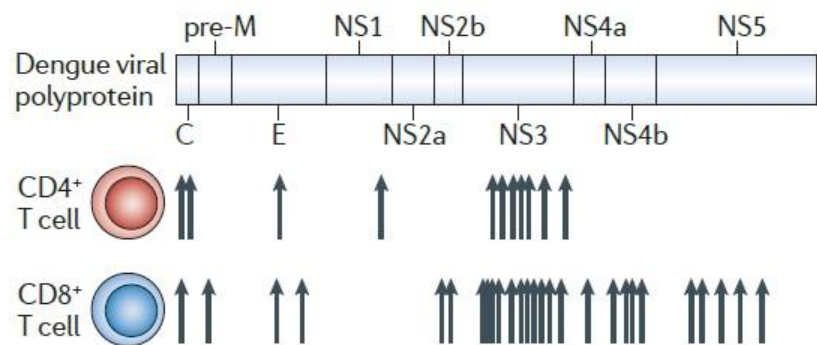
O aumento do número de casos de DG entre 2000-2010, principalmente em 2002 e 2008 (mais 18.000 casos) é impressionante quando comparado com os anos 90 (menos de 1000). A epidemia de 2008 continuou com índices elevados em 2009-2010 com aproximadamente 4.000 casos de DG em 2010. A proporção de casos graves relatados é comparável com o número de

casos encontrados nas Américas, mas é bem menor com relação à Ásia. Em 2010, 13.909 casos foram classificados como FHD e 3807 como DG, sendo que 370 e 308 foram casos fatais respectivamente (Teixeira *et al.*, 2013).

A fisiopatogênese da DCA e DG pode estar associada a fatores do próprio vírus como virulência da cepa (Halstead e Cohen, 2015) ou a fatores intrínsecos do hospedeiro, como a idade, o grupo sanguíneo (Coffey, Mertens, Brehin, *et al.*, 2009), se se trata de uma reinfecção por sorotipo diferente, comorbidades como doenças crônicas, diabetes e asma (WHO, 2009) ou devido à resposta imune desregulada (Mathew e Rothman, 2008; Rouse e Sehrawat, 2010; Rothman, 2011).

A resposta imune ao dengue se inicia quando o vírus infecta as células do sistema imune inato, principalmente células dendríticas, que, como apresentadoras de antígeno profissionais, migram para o linfonodo e promovem a ativação das células T. O receptor de células T (TCR) reconhece os peptídeos virais ligados ao MHC das células dendríticas e este reconhecimento associado à interação com moléculas coestimulatórias ativa as 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 são C, E e NS3 (Fig. 3), sendo que a NS3 é uma das proteínas mais conservadas entre os flavivírus e apresenta um alto nível de conservação de aminoácidos entre os sorotipos de dengue (Duangchinda *et al.*, 2010; Mathew, Townsley e Ennis, 2014).

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

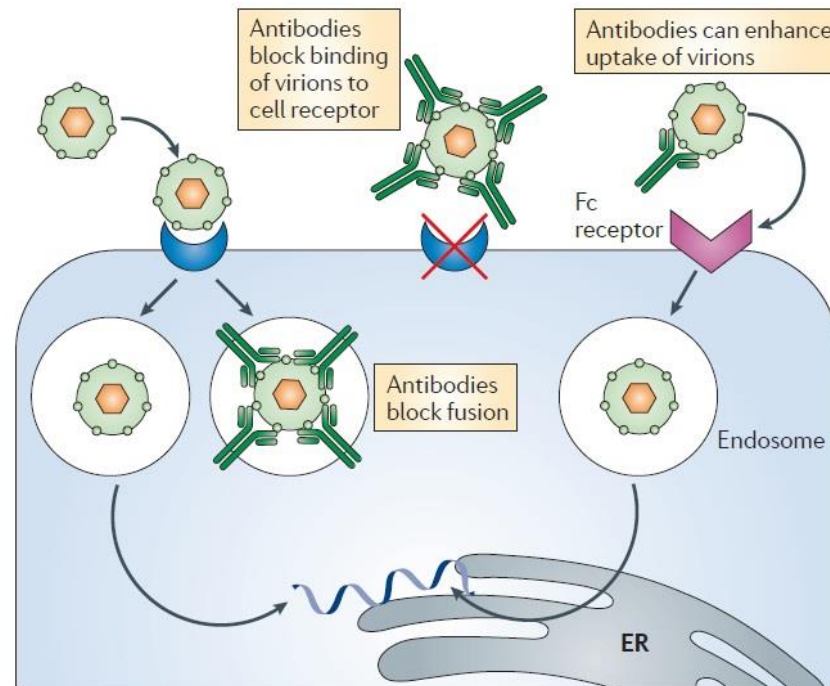


As células T desempenham funções relevantes que contribuem para a eliminação da infecção da dengue. Por exemplo, em uma infecção primária o que normalmente ocorre é a ativação das células T levando à expansão clonal destas e eliminação da infecção. As células T CD8<sup>+</sup> reconhecem as células infectadas e podem eliminá-las (Rothman, 2011), e também produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias como IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  (Hatch, Endy, Thomas, *et al.*, 2011). As células T CD4<sup>+</sup> auxiliam e aumentam a resposta das células T CD8<sup>+</sup> e promovem

a ativação plena das células B, regulam a resposta imune através da liberação de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, elevam o nível de ativação e a capacidade citotóxica de células infectadas, e promovem o desenvolvimento da memória celular (Luhn, Simmons, Moran, *et al.*, 2007; Duangchinda *et al.*, 2010).

Um indivíduo infectado pela primeira vez com o vírus da dengue estará protegido por um longo período à reinfeção pelo mesmo sorotipo (Mathew e Rothman, 2008). Além disso, estará também protegido contra a infecção a qualquer um dos demais sorotipos por um tempo curto. Esta proteção é conhecida como 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 (Ubol, Phuklia, Kalayanarooj *et al.*, 2010; Austin, Dowd, Shrestha, *et al.*, 2012). Tais anticorpos neutralizantes perdem seus títulos rapidamente e em cerca de três meses, os indivíduos estarão tão ou mais susceptíveis aos outros sorotipos do vírus (Dejnirattisai, Jumnainsong, Onsirakul, *et al.*, 2010). Além de protegerem contra a infecção de forma direta ao neutralizarem o vírus, os anticorpos podem se ligar a proteínas virais expressas nas membranas de células infectadas, mais comumente NS1, levando à ativação do sistema do complemento e contribuindo para a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, promovendo então a lise destas células (Nascimento, Silva, Cordeiro, *et al.*, 2009; Mathew, Townsley e Ennis, 2014).

Assim, em uma infecção secundária heterotípica, pode ocorrer uma dengue mais grave, devido à reatividade cruzada de anticorpos não neutralizantes específicos ao sorotipo da infecção primária, mas com reatividade cruzada ao novo sorotipo. Estes anticorpos acabam opsonizando o vírus da infecção heterotípica sem promover neutralização, pois a maioria destes não são neutralizantes. Essa opsonização não neutralizante facilita então que os vírus, mesmo aqueles imaturos que são incapazes de infectar uma célula ativamente, sejam endocitados via Receptores Fc $\gamma$  I e II presentes nas células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas, macrófagos e células B (Beltramello *et al.*, 2010; Ng, Zhang, Tan, *et al.*, 2014). Isto leva ao aumento da replicação viral durante a infecção secundária, elevando a viremia e induzindo as células do sistema imune inato e adaptativo a produzirem grandes quantidades de citocinas (Beltramello *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2014), que por sua vez acabam desencadeando todo o processo patológico da dengue. Este fenômeno é denominado de Aumento Dependente de Anticorpos (Fig. 4) (“Antibody-Dependent Enhancement” ADE) (Rothman, 2011).



**Figura 4 – Aumento Dependente de Anticorpos (ADE).** Representação dos mecanismos de neutralização e ADE de anticorpos específicos ao DENV. Os anticorpos com elevada especificidade ao vírus, ou seja, com maior complementação aos epítopos do vírus, podem bloquear a interação do vírus com os receptores celulares ou bloquear a fusão do vírus com a membrana da vesícula, impedindo a liberação do material genético no citoplasma. Os anticorpos com menor complementação aos epítopos viriais, podem aumentar internalização dos vírus, inclusive os vírus imaturos, através da interação com os Receptores Fc $\gamma$  I ou II. Fonte: (Rothman, 2011).

O ADE foi demonstrado experimentalmente em um trabalho utilizando macacos Rhesus jovens. Estes primatas desenvolveram um quadro típico de DG mesmo em uma infecção primária, quando imunizados passivamente com anticorpos anti-DENV não neutralizantes (Goncalvez, Engle, St Claire, *et al.*, 2007). Outro estudo, ao utilizar anticorpos que possuíam como alvo diferentes epítopos dos 4 sorotipos dengue e modificados de forma que a sua ligação com o receptor Fc $\gamma$  fosse impedida, demonstrou que esta ligação entre os anticorpos e o receptor Fc $\gamma$  é necessária para aumentar a infecção. E o uso destes anticorpos como uma terapia pós-exposição em camundongos que receberam uma infecção letal de DENV levou à neutralização dos vírus dengue tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Beltramello *et al.*, 2010).

Portanto, a resistência à infecção ou à patologia encontrada na dengue mediada pela atividade dos anticorpos dependerá do balanço entre anticorpos neutralizantes e não neutralizantes. Segundo (Chan, Zhang, Tan, *et al.*, 2011), os anticorpos não poderiam neutralizar os DENVs apenas por prevenir a interação viral com receptores celulares ou por inibir a fusão intracelular viral, pois assim apenas os anticorpos que são capazes de bloquear a fusão intracelular conseguiriam neutralizar o vírus através da captação mediada pelo receptor

Fc $\gamma$ , e os demais anticorpos levariam ao ADE. Assim, a utilização de soro humano do início da convalescência de uma infecção primária de dengue demonstrou que a neutralização dos DENVs se dá através da formação de agregados vírus-anticorpo, de modo dependente de concentração, e este complexo permite a ligação cruzada ao receptor inibitório Fc $\gamma$  IIB, expresso em baixos níveis, mas que impede a fagocitose mediada pelo Receptor Fc $\gamma$  e previne assim o ADE (Chan *et al.*, 2011).

Paradoxalmente, (Guzman, Alvarez e Halstead, 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 e Halstead, 2013). Esses dados foram também comprovados experimentalmente em um estudo com camundongos infectados com dengue, o qual investigou como a resposta de células T CD8<sup>+</sup> influencia na resolução da patologia da dengue mediada por anticorpos (Zellweger, Eddy, Tang, *et al.*, 2014). Estes camundongos foram sensibilizados com DENV inativo e logo em seguida desafiados a uma infecção por dengue. Os camundongos desenvolveram uma dengue grave, mediada pela resposta de anticorpos não neutralizantes e somada à ausência de resposta vigorosa de células T CD8<sup>+</sup>. Porém, a transferência de células T CD8<sup>+</sup> ativas contra DENV para estes camundongos preveniu o ADE e ainda reduziu a carga viral (Zellweger *et al.*, 2014).

A ativação linfocitária é fundamental na resistência à infecção. Por exemplo, alguns trabalhos relatam altos níveis de células T CD4<sup>+</sup> produtoras das citocinas TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-2 em pacientes assintomáticos (Hatch *et al.*, 2011; Mathew, Townsley e Ennis, 2014). Entretanto, acredita-se que a hiperativação das células T esteja associada ao desenvolvimento de manifestações hemorrágicas (Duangchinda *et al.*, 2010; Simmons, 2012). De fato, alguns trabalhos demonstram que os níveis de citocinas como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-2 estão muito aumentados em indivíduos com DG (Zellweger, Prestwood e Shresta, 2010; Rothman, 2011).

Além do ADE, outra hipótese que explica o aumento de casos graves observados em uma infecção secundária é o Pecado Antigênico Original. Os linfócitos B e os linfócitos T também podem apresentar reatividade cruzada. Assim, em infecções secundárias, pode ocorrer uma expansão seletiva de clones específicos ao vírus da primeira infecção com reatividade cruzada. Como há uma expansão privilegiada de células com reatividade cruzada, e eventualmente grande parte destas células não são adequadas para combater especificamente o novo vírus, ocorre a ativação de um grande número de células de memória que são de certa



forma ineficientes para combater o segundo vírus. Estas células produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias como  $\text{IFN}\gamma$ , TNF e IL-6, fenômeno conhecido como Tempestade de Citocinas. Esta ocorre no período de febre leva à hiperativação do endotélio, podendo desencadear os sintomas relacionados à permeabilidade vascular, hemorragias e choques (Duangchinda *et al.*, 2010; Rothman, 2011; Zompi e Harris, 2013).

Portanto, de acordo com essas hipóteses, o aumento da carga viral 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 contribuem para patologia da dengue. É importante ressaltar que as complicações encontradas na DCA e DG, como extravasamento plasmático grave, se iniciam quando a viremia está em resolução, e simultaneamente quando há uma forte resposta dos linfócitos T, implicando na produção de elevados níveis de citocinas inflamatórias (Dejnirattisai, Duangchinda, Lin, *et al.*, 2008). Estas observações indicam que o DENV não é o único e nem o grande responsável pela patologia encontrada na dengue, bem como o fenômeno do ADE, pois a viremia causada pelo ADE já estaria controlada.

Recentemente foi demonstrado que os mastócitos de roedores, macacos e humanos são capazes de detectar o DENV, mesmo em concentrações bem reduzidas. Estes são ativados, degranulam e produzem citocinas (King, Marshall, Alshurafa *et al.*, 2000; St. John, Rathore, Yap, *et al.*, 2011). Além disso, os mastócitos possuem receptores Fc que reconhecem os anticorpos que opsonizam o DENV e são assim ativados (King *et al.*, 2000). A resposta dos mastócitos ao vírus da dengue também envolve as vias de ativação antivirais, como MDA5 e RIG-I (St. John *et al.*, 2011). Os mastócitos ativados liberam citocinas vasodilatadoras, como IL-1 $\beta$  e IL-6 (King *et al.*, 2000), citocinas inflamatórias, como TNF $\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ , e quimiocinas, como CCL5, CXCL12 e CXCL1 (St. John *et al.*, 2011). Os mastócitos também degranulam em resposta à infecção por dengue, liberando proteases, leucotrienos e histamina, que induzem a quebra das apertadas junções das células endoteliais e reduzem a coagulação sanguínea, contribuindo para aumento da permeabilidade microvascular, que pode levar ao extravasamento plasmático grave (St John, 2013).

O trabalho de (St. John *et al.*, 2011) demonstrou que camundongos deficientes de mastócitos ou que receberam drogas que estabilizam os mastócitos apresentaram uma infecção por dengue sistêmica com reduzido extravasamento plasmático. Além disso, os mastócitos mostraram importante papel no recrutamento de células NK e contribuem para controle da carga

viral (St. John *et al.*, 2011). Então, os mastócitos juntamente com os fenômenos do ADE e Pecado Antigênico Original, parecem contribuir com patogênese da dengue grave.

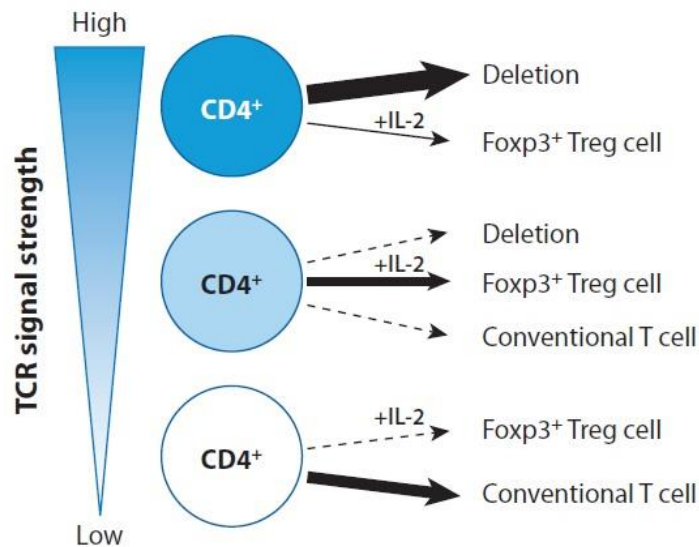
Outros trabalhos abordam mecanismos distintos que proporcionam ou colaboram para a patologia encontrada na dengue grave. Por exemplo, os monócitos também parecem contribuir com a produção de citocinas inflamatórias. Também foi relatada a presença de agregados de plaquetas-monócitos em indivíduos com dengue que apresentavam trombocitopenia e sinais de aumento da permeabilidade vascular. A ligação entre plaquetas ativadas e monócitos leva à secreção de IL-1 $\beta$ , IL-8 e MCP-1 (proteína 1 quimioatrente de monócitos), e a interação de plaquetas apoptóticas com monócitos, sem a necessidade de fagocitose, foi suficiente para induzir a secreção de IL-10, como uma forma imuno-regulatória (Hottz, Medeiros-de-Moraes, Vieira-de-Abreu, *et al.*, 2014). Este trabalho sugere então que a agregação de plaquetas ativadas ou em apoptose contribui para a patogênese da dengue (Hottz *et al.*, 2014). Outro estudo demonstrou que a translocação bacteriana está relacionada à extensiva ativação do sistema imunológico na dengue (Van de Weg, Pannuti, de Araujo, *et al.*, 2013).

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

O controle destas respostas pró-inflamatórias ocorre através da atividade de alguns subgrupos celulares que inibem outras células que medeiam eventos inflamatórios. Isso ocorre por meio da indução de moléculas regulatórias, como PD-1 e CTLA-4, expressas por células T efetoras, ou pela produção de citocinas como IL-10 e TGF $\beta$  (Rouse e Sehrawat, 2010). Além disso, as células T CD4<sup>+</sup> reguladoras (Tregs) medeiam uma resposta anti-inflamatória efetiva em diversas doenças, porém o papel que elas desempenham durante a dengue ainda não foi estudado. As células Tregs 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 e Tarbell, 2009; Josefowicz, Lu e Rudensky, 2012).

As células Tregs humanas são caracterizadas por expressarem CD25<sup>hi</sup>, CD127<sup>low</sup> e FoxP3<sup>+</sup>. Estas células constitutivamente expressam altos níveis de CD25, que é a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2, uma importante citocina para a ativação e sobrevivência de células T, também expressam moléculas imunorregulatórias como CD200, GITR, CTLA-4, LAP e PD-1 (dentre outras), porém nenhuma dessas são consideradas marcadores específicos para a população de Tregs. O fator de transcrição FoxP3 é a assinatura mais usada para discriminar a célula Treg (Josefowicz, Lu e Rudensky, 2012).

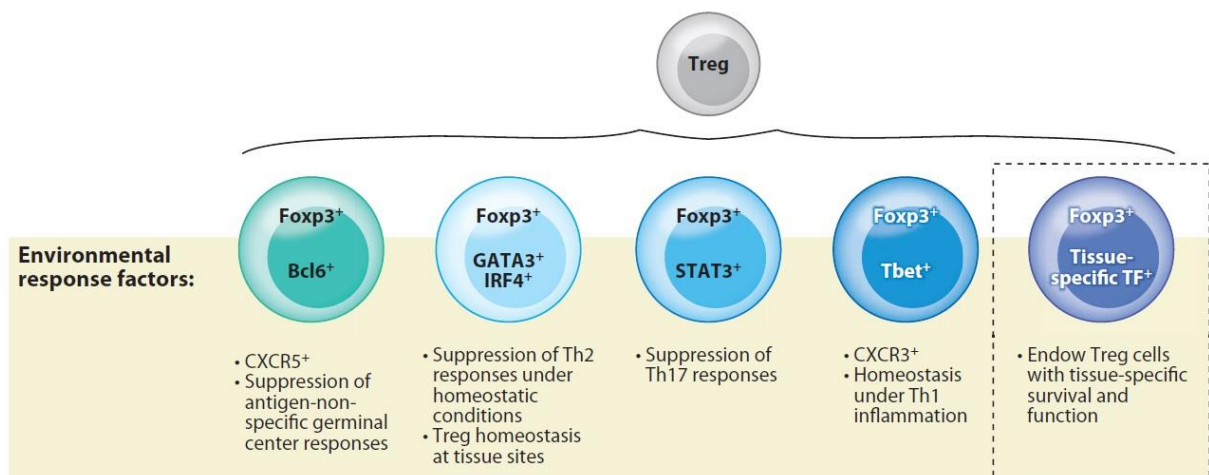
As células Tregs são geradas e amadurecem no timo (Fig. 5), e são conhecidas como células Tregs naturais. Sob certas condições também podem se desenvolver extra-timicamente, sendo conhecidas como Tregs periféricas ou induzidas (Bilate e Lafaille, 2010). Acredita-se que a diferenciação de células Tregs no timo seja promovida por interações de alta afinidade com o complexo peptídeo próprio-MHC (Josefowicz, Lu e Rudensky, 2012). Entretanto, existem alguns trabalhos que demonstram células Tregs naturais específicas a antígenos microbianos. Por exemplo, um estudo realizado com camundongos infectados com o vírus influenza demonstrou a proliferação de Tregs naturais (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 (medLN). Esse estudo ainda demonstrou que tais Tregs específicas não se originaram de células T CD4<sup>+</sup> que sofreram conversão para Tregs induzidas (Bedoya, Cheng, Leibow, *et al.*, 2013).



**Figura 5 - A intensidade do sinal do TCR instrui o destino dos timócitos CD4<sup>+</sup> e a diferenciação de células Tregs.** Linfócitos T CD4<sup>+</sup> recebem sinais de várias intensidades através da interação do TCR com peptídeo-MHC expresso por APCs. A força dos sinais de TCR (ou avides funcional, baseada em uma combinação de afinidade de interação individual do MHC-peptídeo-TCR e a abundância de MHC-peptídeo) e a sua duração determina o destino das células T CD4<sup>+</sup>. Sobre a recepção do sinal do TCR de elevada intensidade, a maioria dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> sofrem a morte celular programada. Os timócitos CD4<sup>+</sup> que recebem sinais do TCR de força intermediária são capazes de escapar da eliminação e são induzidas a se diferenciar em células Tregs. Fonte: (Josefowicz, Lu e Rudensky, 2012).

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, alguns estudos demonstraram que as respostas mediadas pelas Tregs podem influenciar na amplitude da resposta e na subsequente patologia da doença (Belkaid e Tarbell, 2009) em infecções crônicas como Friend vírus (Dittmer, He, Messer, *et al.*, 2004), HIV (Kinter, Hennessey, Bell, *et al.*, 2004) e HCV (Belkaid e Rouse, 2005). Tais estudos demonstraram que o aumento no número das Tregs pode comprometer a eficácia da resposta de T CD8<sup>+</sup> (Hue, Tuan, Thi, *et al.*, 2011) comprometendo o controle adequado dessas infecções.

O ambiente no qual as células Tregs irão atuar requer elementos regulatórios 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 (Fig. 6). Por exemplo, o estudo de (Shafiani, Dinh, Ertelt, *et al.*, 2013) demonstrou que o *Mycobacterium tuberculosis* induziu 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, Rudra, Treuting, *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 6 – Especialização funcional das células Tregs em distintas classes de resposta imune.** As células Tregs geradas no timo ou na periferia, podem se especializar através da superregulação ou ativação dos fatores de transcrição em resposta a diferentes estímulos encontrados no ambiente. Os fatores de resposta encontrados no meio podem cooperar com o FoxP3 para conferir às células Tregs um estado transitório ou permanente, o que permite sua função sob medida sob distintos microambientes. Fonte: (Josefowicz, Lu e Rudensky, 2012).

Surpreendentemente há poucos estudos acerca da funcionalidade e influência imunopatológica das células Treg em indivíduos acometidos com dengue. Mas em um estudo comparativo acerca do mecanismo de ação e função das células Treg em pacientes com DSA e DG, verificou-se alteração na razão da frequência de células Treg/células T efectoras, e esta razão é significativamente elevada em pacientes com DSA (Luhn *et al.*, 2007).

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 e à resistência à doença.

## **2. HIPÓTESE**

Uma vez que a alta frequência de células Tregs pode estar associada a um pior prognóstico por suprimir a resposta imune efetora ou a uma melhor evolução clínica por controlar a resposta inflamatória sistêmica, nossa hipótese é que o comprometimento da função das células Treg pode influenciar o desenvolvimento da dengue grave. Portanto, o estudo da regulação da resposta imune através da expressão de mediadores anti-inflamatórios e moléculas inibitórias permitirá compreender melhor a função de células Treg em indivíduos infectados pelo vírus da dengue.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo Geral*

Investigar o perfil de resposta inflamatória e o perfil das células T reguladoras em indivíduos acometidos por dengue com ou sem sinais de alarme.

#### 3.2 *Objetivos Específicos*

1- Realizar diagnóstico clínico, sorológico e molecular, através dos métodos:

ELISA – verificar a presença de anticorpos e assim distinguir infecção primária e secundária.

CBA – avaliar o nível de citocinas inflamatórias presentes na circulação periférica durante a fase aguda.

qRT-PCR – realizar a tipagem viral e a quantificação da carga viral.

2- Avaliar e comparar o perfil da resposta de células T entre indivíduos DSA e DCA em vários momentos da infecção, na presença ou ausência de estímulo imunogênico.

3- Avaliar e comparar os indivíduos DSA e DCA em vários momentos da infecção, o perfil das células T regulatórias na presença ou ausência de estímulo imunogênico.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho, que teve início em Janeiro de 2013, foi aprovado pelo Comitê de Ética – CPqRR e conta com o financiamento do CNPq (processo número 404138/2012-8). 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 Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisa René Rachou em Minas Gerais. Os indivíduos convidados a participar deste Projeto foram devidamente informados acerca deste e assinaram Termo de Consentimento (Anexo 1).

### 4.1 *Recrutamento de Pacientes*

Indivíduos de qualquer idade e sexo não-imunes à dengue ou com suspeita de dengue foram recrutados na Comunidade, no Centro de Saúde Jardim Montanhês e nos Hospitais Santo Ivo e Santa Casa. As amostras de sangue periférico (60 mL) foram coletadas em tubos coletores a vácuo heparinizados. No caso dos pacientes as coletas foram feitas em três momentos diferentes: 3-4 dias após o início dos sintomas (período febril), 6-12 dias após o início dos sintomas (período defervescência) e 30 dias após o início dos sintomas (período convalescência).

### 4.2 *Classificação Clínica da Dengue*

Os pacientes foram classificados de acordo com o quadro clínico detalhado nos prontuários, através da avaliação sintomática característica que define o paciente como dengue sem sinais de alarme, dengue com sinais de alarme ou dengue grave, segundo critérios da OMS (Fig.7). As manifestações clínicas encontradas nos indivíduos DSA são principalmente caracterizadas por febre aguda que dura de 3-7 dias, e pode ser acompanhada de sinais e sintomas inespecíficos tais como cefaleia, mialgia, artralgia, anorexia, náuseas, exantemas, leucopenia e prova do laço positivo, mas que na grande maioria das vezes costuma se resolver sem complicações (Brasil, 2011). Já os sujeitos que são classificados com DCA apresentam febre acompanhada de pelo menos 2 sintomas de alarme, tais como dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, entre outros.



Os critérios usados para classificar os pacientes como DG são o extravasamento plasmático grave, sangramento grave e/ou comprometimento grave dos órgãos (Brasil, 2011).



**Figura 7 – 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).

#### 4.3 Processamento de Amostras

No mesmo dia da coleta, foi feita a separação de plasma e PBMC (células mononucleares do sangue periférico), através da centrifugação utilizando Ficoll Hipaque (SIGMA), que separa os componentes do sangue por diferença do gradiente de densidade. Quando necessário, as amostras foram mantidas a 4°C até o momento do processamento. As

amostras de plasma foram armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , e as células lavadas, contadas e ressuspensas em meio de congelamento (meio DMEM/Soro Bovino Fetal (SBF) + 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) da SIGMA), mantidas por cerca de 24 h a  $-80^{\circ}\text{C}$  e então transferidas para o botijão contendo nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) até o uso.

#### 4.4 Diagnósticos clínicos e sorológico

Todos os indivíduos incluídos na pesquisa foram submetidos a testes sorológicos para dengue. O diagnóstico sorológico para dengue com a detecção de IgM e IgG foi realizado utilizando o kit ELISA PanBio (Inverness Medical Innovations Australia Pty Ltd) de acordo com as normas do fabricante. Indivíduos apresentando IgG no período febril (3-4 dias) foi considerado como caso de infecção secundária. A leitura foi realizada no equipamento Espectra MAX Plus (Molecular Devices) utilizando o programa ProSoft Max.

A quantificação de citocinas circulantes em plasma descongelado pela primeira vez foi feita utilizando os Kits de CBA Inflamatório Humano da BD (IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70 e TNF) e CBA Th1/Th2/Th17 Humano da BD (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN $\gamma$  e IL-17A) de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram adquiridos no equipamento BD FACSVersé utilizando o software BD FACSuite.

#### 4.5 Cultura de Células e Vírus

As células C636, da larva completa do mosquito *Aedes albopictus*, foram utilizadas para aumento de título viral. As células C636 foram cultivadas em meio Leibovitz 5% SBF e 1% Penicilina/Estreptomicina. Ao atingirem cerca 95% de confluência, estas células foram infectadas com 1 dos 4 sorotipos virais 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  $-196^{\circ}\text{C}$ .

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 24 h, as células foram infectadas com 1 dos 4 sorotipos virais e incubadas por 5 dias em estufa úmida com 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após o

término de incubação, as células foram fixadas utilizando solução de paraformaldeído 10% tamponado e deixadas em temperatura ambiente por cerca de 24 h. 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.

#### 4.6 Diagnóstico molecular

O RNA foi extraído do sobrenadante de cultura de C636 infectado com 1 dos 4 sorotipos, para serem utilizados como curva padrão do PCR quantitativo (qPCR), e de plasma 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), Taq DNA Polymerase from *Thermus aquaticus* (SIGMA), oligos iniciadores e sondas descritos anteriormente (Tabela 1) (Hue *et al.*, 2011). As reações foram processadas no equipamento Applied Biosystems da ABI Prism. O programa utilizado para reação foi o SDS 2.4, com os seguintes ciclos: 25°C/60min; 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 C636 infectadas com 1 dos 4 sorotipos virais.

**Tabela 1 – Oligo Iniciadores (Primers) e Sondas**

<b>Sorotipo</b>	<b>Sequência dos Primers e Sondas (5'-3')</b>
DENV1-F	ATCCATGCCCCAYCACCAAT
DENV1-R	TGTGGGTTTTGTCCTCCATC
DENV1-Sonda	<b>FAM</b> -TCAGTGTGGAATAGGGTTTGGATAGAGGAA-BHQ1
DENV2-F	TCCATACACGCCAAACATGAA
DENV2-R	GGGATTCCTCCCATGATTCC
DENV2-Sonda	<b>FAM</b> -AGGGTGTGGATTCGAGAAAACCCATGG-BHQ1
DENV3-F	TTTCTGCTCCCACCACTTC
DENV3-R	CCATCCYGCTCCTTGAGA
DENV3-Sonda	<b>Cyan500</b> -AAGAAAGTTGGTAGTTCCTGCAGACCCCA-BHQ1
DENV4-F	GYGTGGTGAAGCCYCTRGAT
DENV4-R	AGTGARCGGCCATCCTTCAT
DENV4-Sonda	<b>Cyan500</b> -ACTTCCCTCCTCTTYTTGAACGACATGGGA-BHQ1

#### 4.7 Biblioteca de Peptídeos

Os peptídeos, obtidos da Mimotopes Australia (The Peptide Company), foram construídos com o comprimento de 15 aminoácidos (a.a.) com descolamento de 5 a.a., cobrindo totalmente a sequência primária das proteínas E (Epr) e NS3 de DENV1 e DENV4, o que gerou 97 peptídeos da Epr de DENV1, 96 peptídeos da Epr de DENV4 (1 peptídeo estava insolúvel provavelmente devido a impurezas), 123 peptídeos da NS3 de DENV1 e 123 peptídeos da NS3 de DENV4. Os peptídeos foram ressuspensos em DMSO (20mg/mL). A partir de cada peptídeo ressuspensão foi preparada a biblioteca de peptídeos sobrepostos das proteínas Epr DENV1 (206µg/mL), Epr DENV4 (206µg/mL), NS3 DENV1 (162µg/mL) e NS3 DENV4 (162µg/mL).

#### 4.8 Citometria de fluxo

A análise das PBMC utilizando a técnica de Citometria de Fluxo permitiu identificar e caracterizar, por meio de 2 painéis distintos, as células e citocinas que estão envolvidas na resposta contra infecção da dengue.

##### 4.8.1 Cultura de Células

As PBMC foram descongeladas em banho Maria a 37°C e transferidas para tubo contendo meio RPMI com 20 µg/mL de Benzonase Nuclease (SIGMA). Após centrifugação, as células foram distribuídas em placas de cultura estéreis de 96 poços na concentração de  $1,0 \times 10^6$  células/poço. Após um período de ambientação de cerca de 2 horas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, as células foram cultivadas por mais 10 horas em 4 condições experimentais distintas: a) ausência de estímulo, b) estímulo com biblioteca de peptídeos da proteína Epr do vírus DENV1 (2,0 µg/mL), c) estímulo com biblioteca de peptídeos da proteína NS3 do DENV1 (0,2 µg/200mL), e d) estímulo com anticorpos anti-CD3 (1,0 µg/mL – BD) e anti-CD28 (0,5 µg/mL – BD). Em todas as condições de cultura foi adicionado Brefeldina A (1,0 µg/mL – BD) (BioLegend). Após o período de incubação as células foram lavadas e marcadas para avaliação por citometria de fluxo com os painéis de citocinas e células Treg, descritos abaixo.

#### 4.8.2 Pannel de citocinas

Foi usado um indicador de viabilidade celular LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, neste trabalho denominado de ViViD (Life Technologies), que reage com amins livres, tanto na superfície quanto no interior das células. Caso a célula tenha perdido a integridade de membrana, o que distingue as células vivas das mortas é a menor ou maior incorporação, respectivamente, do ViViD. Além disso, este pannel é composto pelos seguintes marcadores de superfície celular: CD3 (Qdot 655 – Invitrogen), CD4 (V500 – BD) e CD8 (Qdot 605 – Invitrogen) que caracteriza duas subpopulações de células T; e a marcação intracelular de CD3 (Qdot 655 – Invitrogen), IFN $\gamma$  (PE/Cy7 – BD), IL-2 (APC – Ebioscience) e TNF $\alpha$  (PE/Alexa 700 – Invitrogen), que distinguem as células Th1 (Mangada e Rothman, 2005; Imrie, Meeks, Gurary, Sukhbataar, Kitsutani, Effler e Zhao, 2007); IL-4 (Alexa 488 – Ebioscience) e IL-13 (FITC – Ebioscience) que caracterizam as células Th2 (Mangada e Rothman, 2005; Imrie *et al.*, 2007); IL-17A (PerCP/Cy5.5 – Ebioscience), que é produzido por células Th17 (Francisco, Sage e Sharpe, 2010; Weissler, Garcia, Kropf, Aitken, Bedoya, Wolf, Erikson e Caton, 2015); e IL-10 (PE – Ebioscience), que caracteriza um padrão mais regulatório (Hottz *et al.*, 2014).

#### 4.8.3 Pannel de células T regulatória

Este pannel é composto pelo ViViD (Life Technologies), CD3 (Qdot 655 – Invitrogen), CD4 (V500 – BD), CD127 (APC/e-Fluor 780 – Ebioscience), que é o receptor de IL-7, está presente em células T de memória e naive e pouco expresso em células Treg e ativadas (Josefowicz, Lu e Rudensky, 2012), CD25 (Alexa 700 – BD), que compõe o receptor de IL-2 de alta afinidade e que está presente em células T ativadas e células Treg (Josefowicz, Lu e Rudensky, 2012), PD-1 (BV605 – Biolegend), que possui uma função relacionada com a tolerância periférica (Belkaid e Tarbell, 2009) – as células T ativadas expressam PD-1, e sua ativação resulta na inibição da proliferação de células T e secreção de citocinas (Francisco, Sage e Sharpe, 2010); GITR (FITC – Ebioscience), que está envolvido no desenvolvimento de células Treg (Shimizu, Yamazaki, Takahashi, *et al.*, 2002); LAP (PerCP – R&D), que é um marcador de células Treg ativadas - LAP associado ao TGF $\beta$  previne a ativação precoce desta citocina que está envolvida no processo de regulação de função e proliferação da célula (Duan, So, Mehta, *et al.*, 2011); CD200 (PE/Cy7 – Ebioscience), que é uma molécula co-estimulatória para a proliferação de células T, é encontrado em células T ativadas e está envolvido na

supressão da atividade de macrófagos (Barclay, Wright, Brooke *et al.*, 2002); e a marcação intracelular de CD3 (Qdot 655 – Invitrogen); IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória (Belkaid e Tarbell, 2009); e FoxP3 (APC – Ebioscience), que é o principal gene regulatório e é o principal marcador de células T reguladoras (Belkaid e Tarbell, 2009).

Após marcação das PBMC os dados foram adquiridos no equipamento BD LSRFortessa utilizando o software BD FACSDiva.

#### 4.8.4 Análises

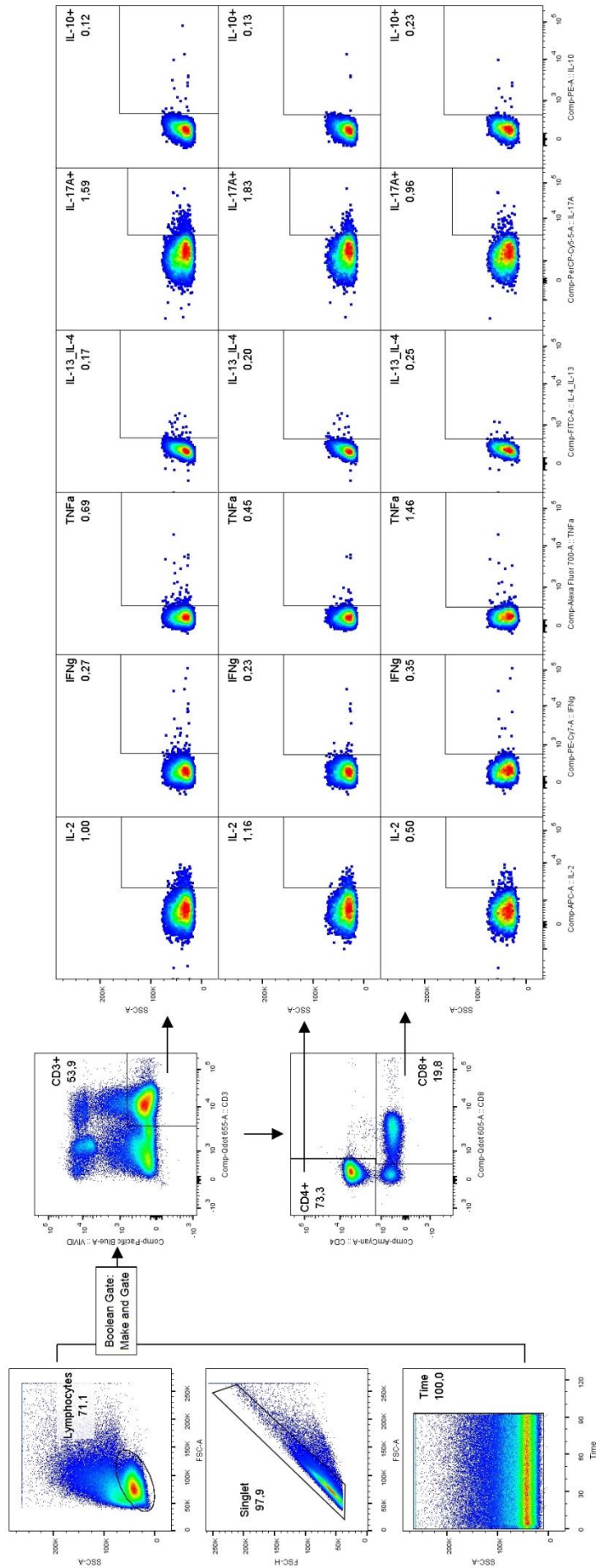
As análises foram realizadas utilizando o Programa FlowJo versão 10 e as estratégias de *gate* utilizadas estão demonstradas nas Fig.8 para citocinas e Fig.9 para células Tregs. A estratégia de *gate* utilizada tanto para as análises dos painéis de citocinas e Tregs consiste primeiramente na seleção das populações de linfócitos (SSC-A x FSC-A), no *gate* de Singlet (FSC-H x FSC-A), que é utilizado para exclusão de grumos celulares, e o *gate* de Time (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* de ViViD x CD3, onde foi selecionada a população de linfócitos T vivos (ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>) (Fig.8).

A partir do *gate* de células ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, para o Painel de Citocinas (Fig.8) foram selecionadas as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) e CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>). Dentro do *gate* de células ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> determinou-se as populações de células que produziam as citocinas IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4/IL-13, IL-17A e IL-10 (ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> IL-4/IL-13<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup>, e ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>), e por fim, os *gates* de citocinas selecionados nas células T ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, foram integralmente transferidos para as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> IL-2<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> IL-4/IL-13<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> IL-17A<sup>+</sup>, e ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> IL-10<sup>+</sup>) e também transferidos para os linfócitos T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> IL-2<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> IL-4/IL-13<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup>, e ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>).

A começar da população de ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, para o Painel de Tregs (Fig.9), foi selecionado o *gate* da subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em seguida foram selecionados nos *dot plots* de CD25 x FoxP3 a população duplo positiva CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> e no *dot plot* de CD25 x 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>) nos *gates* destes dois *dot plots* (CD25xFoxP3 e CD25xCD127) foram definidas as células Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>). Enfim, os *gates* para GITR<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>, LAP<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> e PD-1<sup>+</sup> foram selecionados na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> GITR<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> LAP<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD200<sup>+</sup>, e ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>) e estes foram transferidos inteiramente para a população de células Tregs, que deu origem as populações ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> GITR<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> LAP<sup>+</sup>, ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> CD200<sup>+</sup>, e ViViD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>.

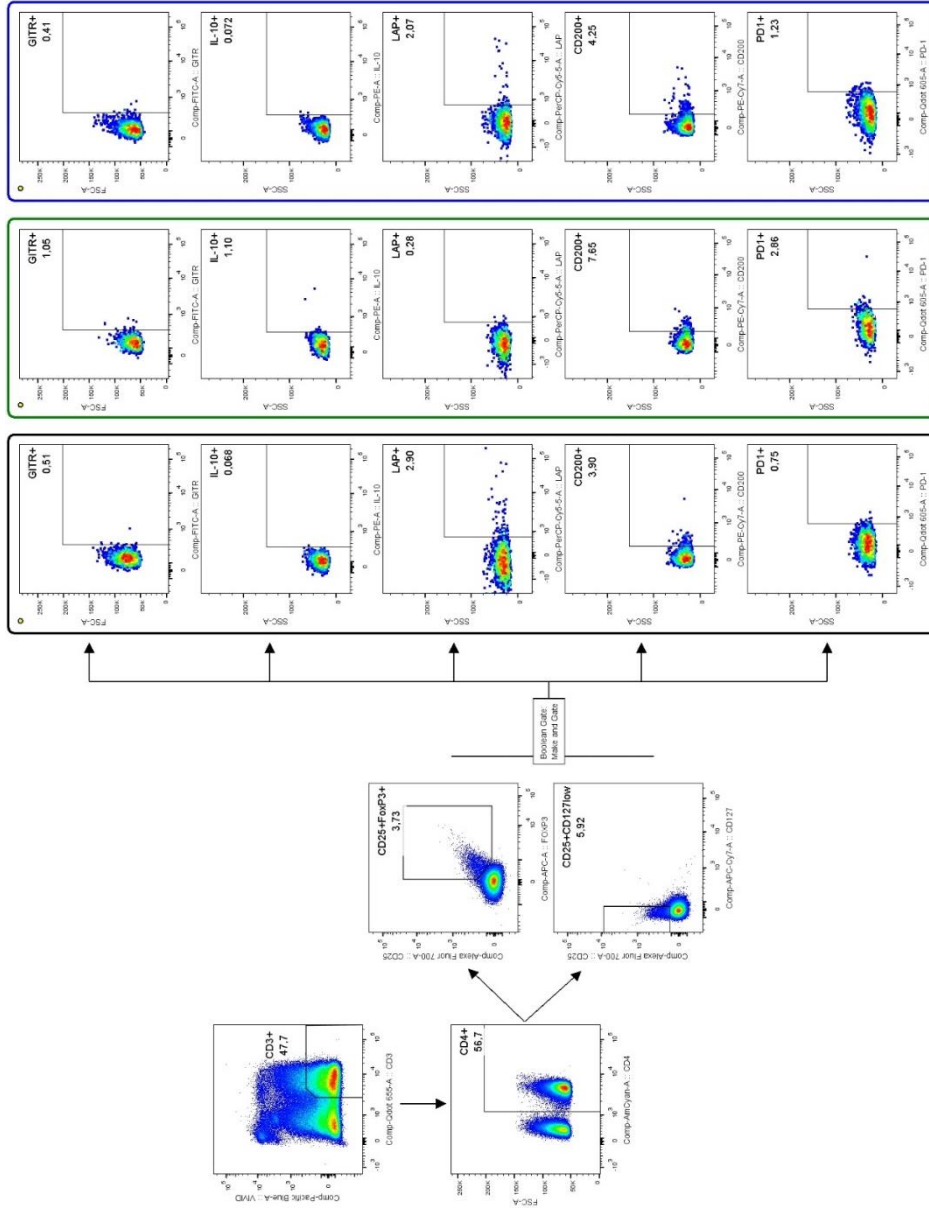
#### 4.9 Análises Estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prism (GraphPad) versão 6.0. Os resultados foram analisados utilizando os testes estatísticos: Mann-Whitney test e Wilcoxon test. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativa quando  $P \leq 0.05$ .



**Figura 8 - Estratégia de Gate do Painel de Citocinas.** Foram selecionadas as populações de Linfócitos, *Singlet* (para exclusão de grumos de células) e *Time* (exclusão de interrupções no fluxo). Em seguida, para obter a interseção destes três *gates* iniciais, foi utilizada a ferramenta *Boolean Gate* opção *Make and Gate* do programa *Flow Jo*, resultando no *dot plot* de onde foi selecionada a população CD3<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>VViD). Dentro deste grupo celular selecionou-se as populações CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD8) e CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Por fim, selecionou-se os *gates* das células CD3<sup>+</sup> que apresentavam as citocinas (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-4/IL-13, IL-17A e IL-10), e estes *gates* foram integralmente transferidos para as populações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.





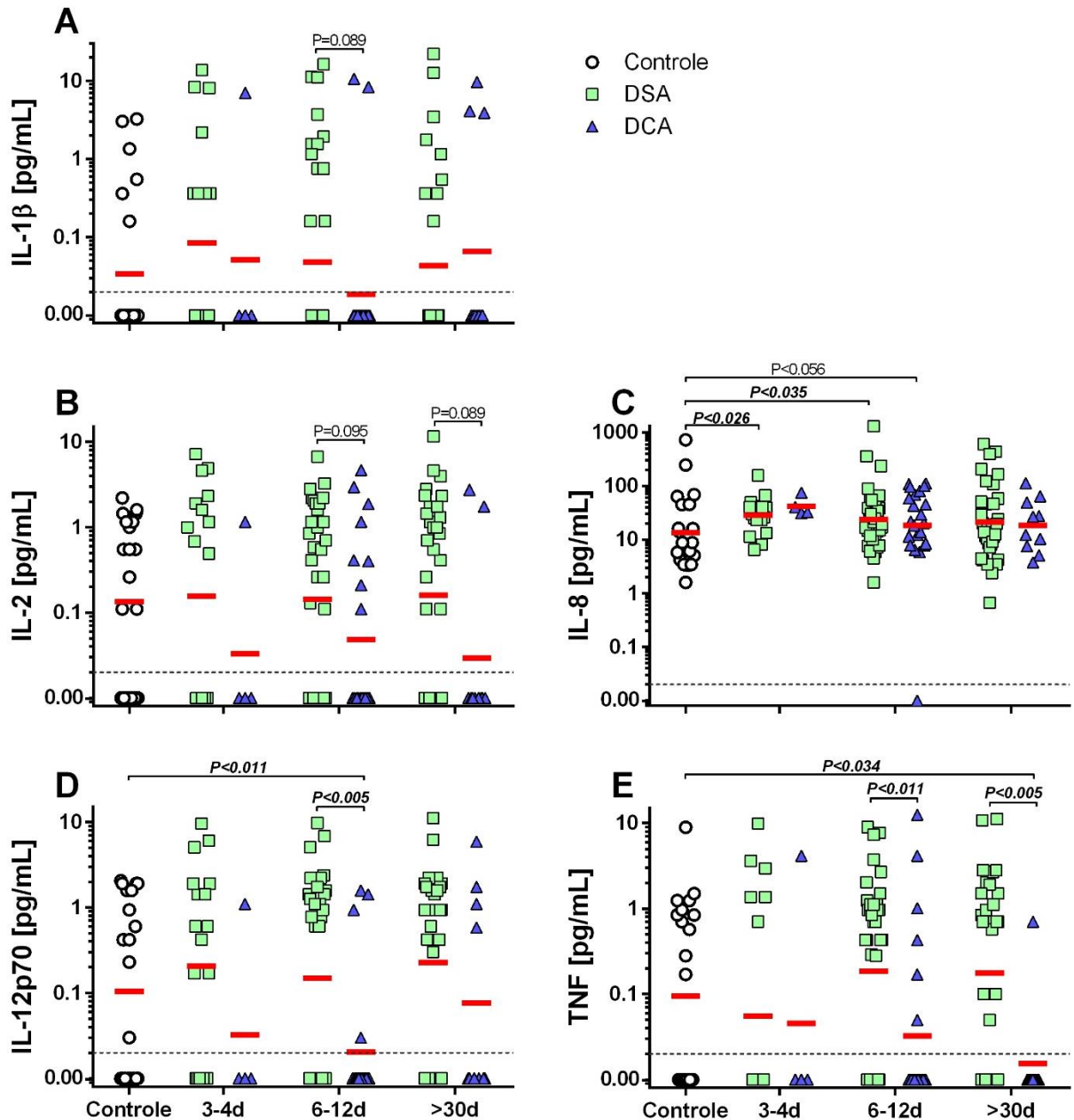
**Figura 9 - Estratégia de Gate do Painel de Treg.** Selecionou-se as populações contidas nos *gates* de Linfócitos, *Singlets* e *Time*, e com o auxílio da ferramenta *Boolean Gate* opção *Make and Gate* do programa Flow Jo, obteve-se o *dot plot* CD3<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>ViViD). Em seguida, fez-se o *gate* das células CD4<sup>+</sup>, e dentro deste grupo selecionou-se as populações: 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 o *gate* para GTR<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>, LAP<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup> e PD-1<sup>+</sup> dentro do grupo de CD4<sup>+</sup> e transferiu-se inteiramente para a população obtida de células Tregs. A linha agrupam as células Tregs e seus marcadores proveniente de indivíduos Controle (preto), DSA (verde) e DCA (azul).

## 5. RESULTADOS

### *5.1 Indivíduos com DCA desenvolvem uma resposta sistêmica inflamatória escassa associada a altos níveis plasmáticos de IL-10*

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). Portanto, para verificar a existência dessa Tempestade de Citocinas e o perfil inflamatório na circulação periférica em pacientes com dengue, medimos a presença de várias citocinas pró-inflamatórias e regulatórias utilizando os Kits de CBA Inflamatório e CBA Th1/Th2/Th17.

Não encontramos variações importantes da concentração plasmática de IL-1 $\beta$ , IL-2 e de IL-8 entre os diferentes grupos estudados (Fig. 10 A, B e C). Entretanto, observamos que os indivíduos com DCA apresentaram níveis menores de IL-12p70 e TNF quando comparados aos indivíduos com DSA e às vezes até mesmo quando comparados aos controles (Fig. 10 D e E), sugerindo uma inadequação da resposta inflamatória nesse grupo. Os indivíduos com DCA apresentaram níveis significativamente menores de IL-12p70 comparado aos indivíduos Controle e DSA, cerca de 7 dias após o início dos sintomas (Fig. 10 D). A concentração de TNF encontrada no grupo DCA, tanto no período de defervescência quanto no de convalescência, é significativamente menor do que as encontradas nos grupos Controle e DSA (Fig. 10 E).



**Figura 10 – Indivíduos com DCA desenvolvem uma resposta inflamatória sistêmica escassa.** As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-12p70 e TNF (A-E) foram mensuradas em plasma de indivíduos Controle (círculo aberto), DSA (quadrado verde claro) e DCA (triângulo azul claro) utilizando Kit de CBA Inflamatório. As linhas vermelhas representam a Média Geométrica. Controle n=22, 3-4d DSA n=19 e DCA n=4, 6-12d DSA n=39 e DCA n=22, >30d DSA n=33 e DCA n=10. Teste estatístico Mann-Whitney.

Os sujeitos classificados como DSA apresentaram aumento significativo nos níveis plasmática de IFN $\gamma$  nos tempos de 3-4 dias e 6-12 dias após o início dos sintomas comparado ao Controle ( $p=0,0032$  e  $p=0,0274$ ). Curiosamente, os níveis de IFN $\gamma$  encontrados no grupo DCA 30 dias após o início dos sintomas são significativamente menores quando comparado ao grupo Controle ( $p=0,0391$ ). Observamos queda gradual significativa na concentração de IFN $\gamma$  durante a evolução clínica dos indivíduos DSA desde o período febril com retorno aos níveis

basais na convalescência. Além disso, os níveis de IFN $\gamma$  encontrados nos indivíduos DSA, tanto na defervescência quanto na convalescência, são significativamente elevados comparado com DCA nos mesmos períodos analisados (Fig. 11 A).

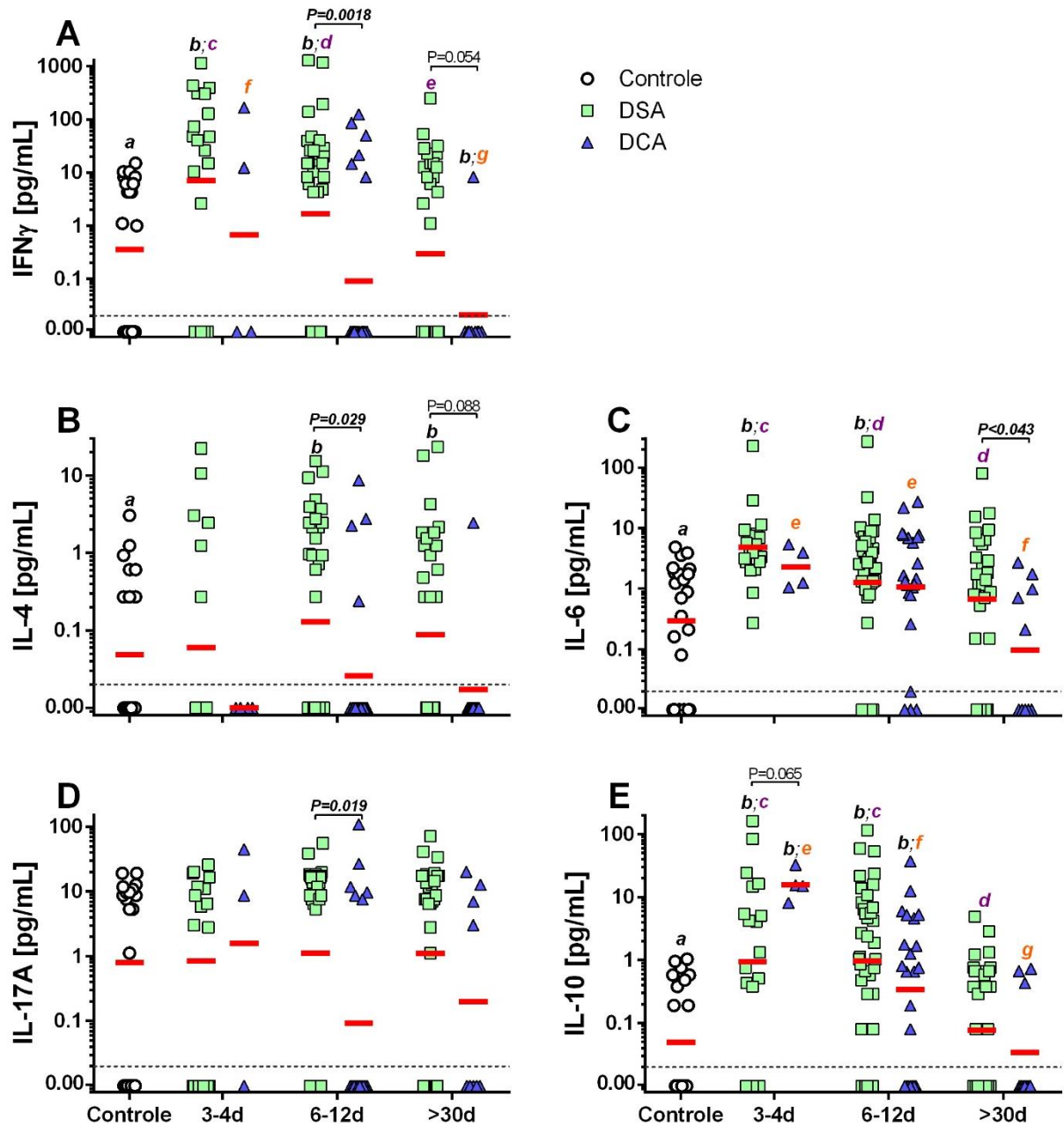
O grupo DSA, durante a fase de defervescência e convalescência, exibiu aumento significativo de IL-4 com relação aos grupos Controle ( $p=0,0168$  e  $p=0,0657$ ) e DCA no período de defervescência (Fig. 11 B).

Observamos que a concentração plasmática de IL-6 nos indivíduos com DSA encontrou-se elevada tanto 3-4 dias quanto de 6-12 dias após o início dos sintomas, em relação ao grupo Controle ( $p<0,0001$  e  $p=0,0091$ ). No período de 3-4 dias os indivíduos DSA possuem concentração plasmática de IL-6 significativamente maior do que as concentrações observadas 6-12 dias e 30 dias ( $p=0,0324$  e  $p=0,002$ ). Com relação à DCA, observamos que os níveis de IL-6 foram reduzidos significativamente 30 dias após o início dos sintomas comparado aos tempos iniciais da evolução clínica ( $p=0,034$  e  $p=0,0048$ ). Encontramos um aumento significativo na concentração plasmática de IL-6 nos sujeitos DSA com relação aos DCA no período de convalescência (Fig. 11 C).

Os pacientes com DSA apresentaram níveis significativamente maiores de IL-17A durante a defervescência comparado com DCA no mesmo período (Fig. 11 D), embora tais níveis não sejam diferentes do grupo controle.

Já os níveis circulantes da citocina anti-inflamatória IL-10 foram significativamente maiores nos indivíduos com dengue, apresentando um pico no período febril e redução gradativa até atingirem os níveis basais na convalescência ( $b>a$  onde  $p<0,009$ ). Curiosamente, durante o período febril, os indivíduos do grupo DCA apresentaram níveis cerca de 10 vezes maiores de IL-10 comparado com os indivíduos DSA no mesmo período (Fig. 11 E).

Os resultados de citocinemia sugerem uma montagem mais precoce e eficaz da resposta inflamatória nos indivíduos DSA em relação aos DCA. Estes níveis aumentados de IL-8, IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-6 encontrados no grupo DSA podem indicar a presença da Tempestade de Citocinas na circulação periférica.



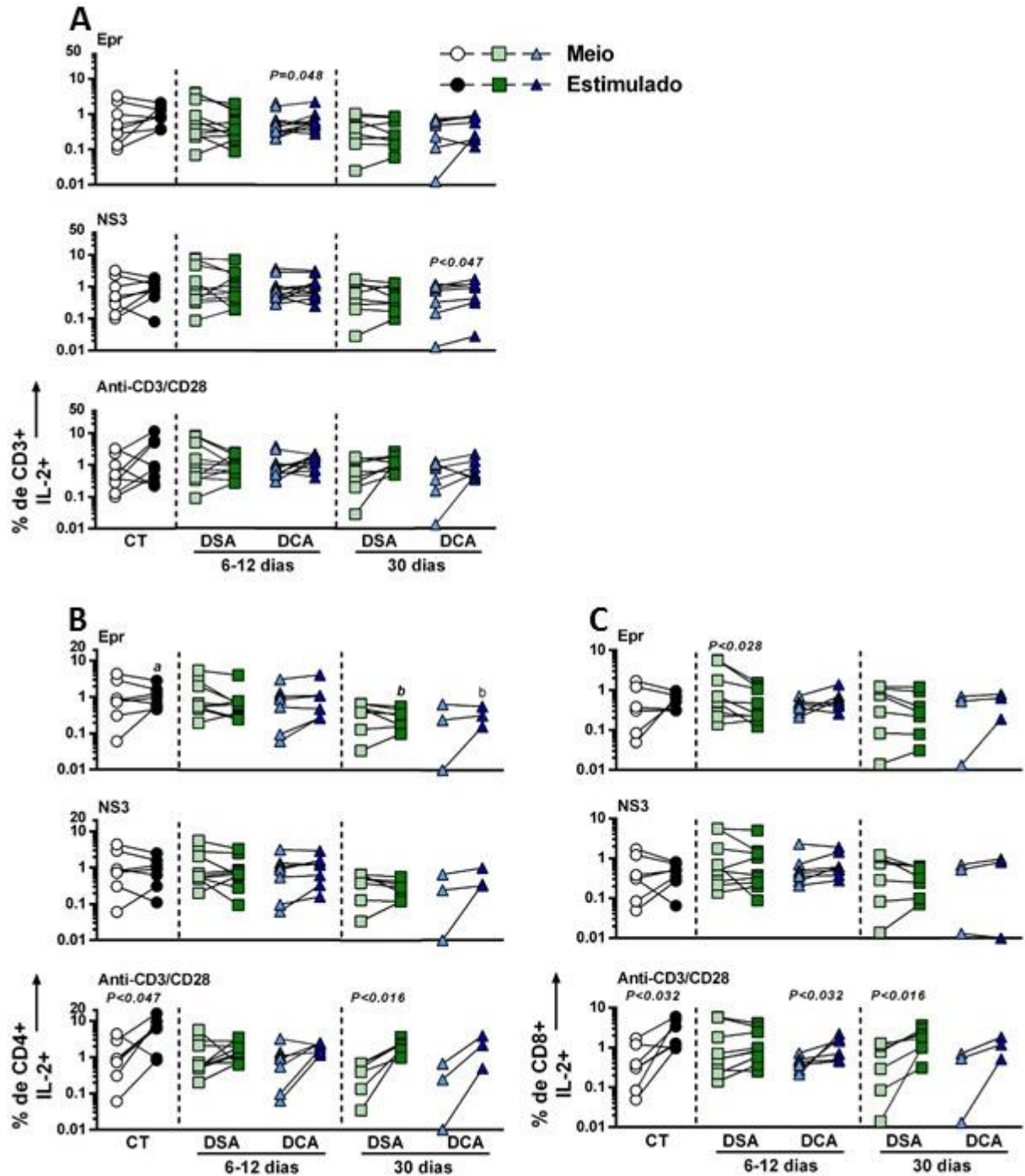
**Figura 11 – Indivíduos com DCA desenvolvem resposta inflamatória sistêmica fraca associada a altos níveis plasmáticos de IL-10.** As citocinas IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-17A e IL-10 (A-E) foram mensuradas em plasma de indivíduos Controle (círculo aberto), DSA (quadrado verde claro) e DCA (triângulo azul claro) utilizando Kit de CBA Th1, Th2 e Th17. As linhas vermelhas representam a Média Geométrica. Letras diferentes, com a mesma cor, indicam diferença estatística entre os grupos.  $p \leq 0,005$ . Cor *violeta* representam DSA e cor *laranja* representa DCA. Controle n=22, 3-4d DSA n=19 e DCA n=4, 6-12d DSA n=39 e DCA n=22, >30d DSA n=33 e DCA n=10. Teste estatístico Mann-Whitney.

## 5.2 Linfócitos T específicos ao DENV de indivíduos do grupo DSA produzem citocinas de perfil Th1

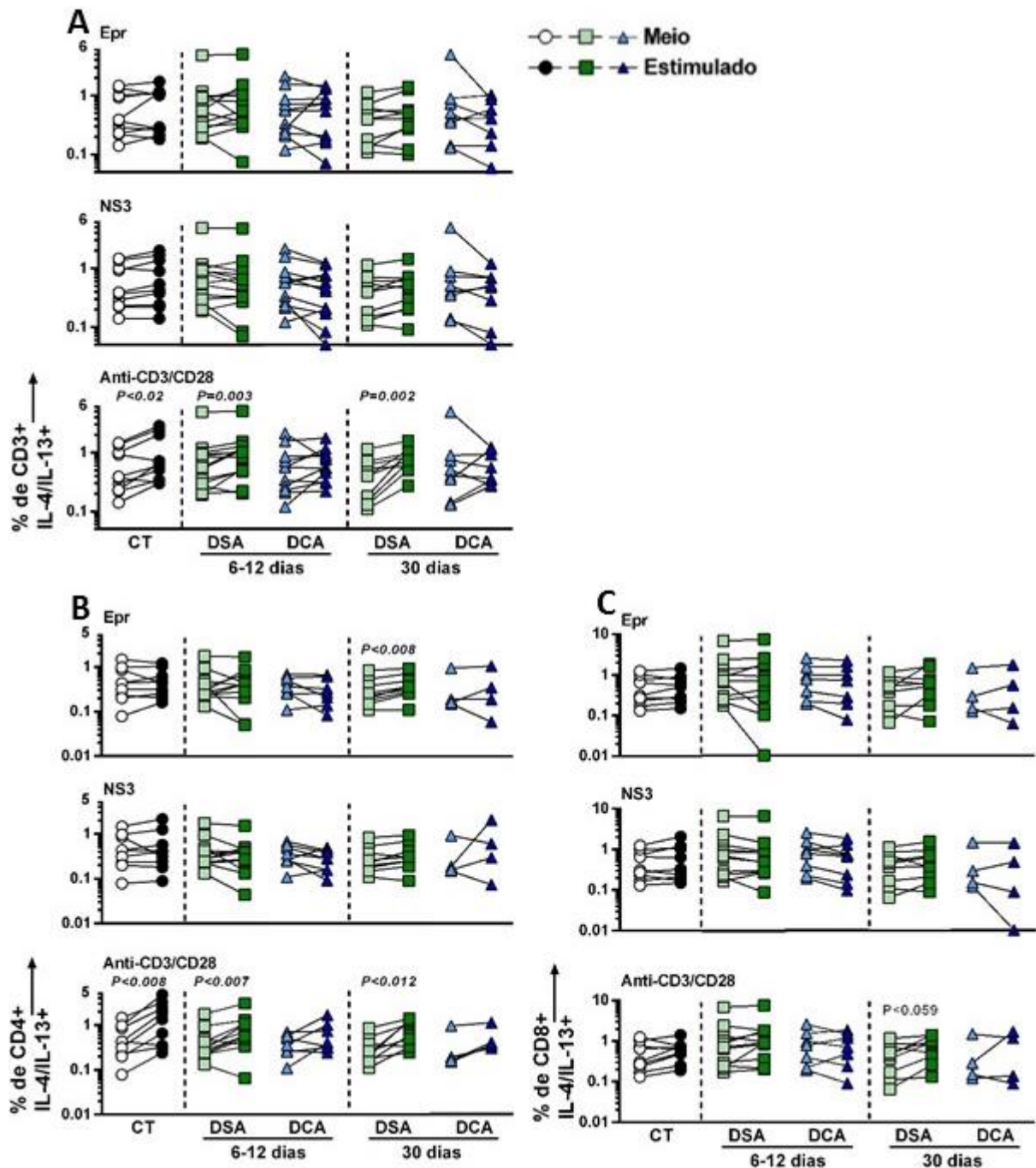
Durante uma infecção, o sistema imune inato e adaptativo são ativados para combater o agente agressor, e a resposta é direcionada de acordo com o tipo de estímulo. A fim de controlar a replicação viral, as células T produzem citocinas inflamatórias, principalmente  $IFN\gamma$ , que compõe respostas de perfil Th1.

Assim, para investigar a produção das citocinas por linfócitos T, estimulamos PBMC de indivíduos dos diversos grupos com bibliotecas de peptídeos do DENV1 cobrindo toda a proteína Epr ou NS3. Essa preparação contém a maior parte dos epítomos reconhecidos por células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , sendo as proteínas mais imunogênicas do vírus dengue (Duangchinda *et al.*, 2010; Rothman, 2011). O estímulo policlonal anti-CD3/anti-CD28 também foi utilizado nas culturas.

Não observamos alterações relevantes da produção de IL-2, IL-4/IL-13 ou IL-17A por células T  $CD3^+$  (Figs. 12-14), células T  $CD4^+$  (Fig. 12-14 B) ou  $CD8^+$  (Fig. 12-14 C) após estimulação com Epr durante a infecção pelo DENV. Algumas tendências ou pequenas diferenças significativas são detectadas: a elevada frequência de células T  $CD3^+IL-2^+$  após estímulo com Epr ou NS3 durante o período de defervescência ou convalescência dos indivíduos DCA respectivamente (Fig. 12 A); redução significativa da produção de IL-2 por células T  $CD8^+$ , quando estimuladas com NS3, dos indivíduos DSA durante a defervescência (Fig. 12 C); aumento de células  $CD4^+IL-4/IL-13^+$  específicas ao Epr do grupo DSA 30 dias após o início dos sintomas (Fig. 13 B); maior frequência de células  $CD3^+IL-17A^+$  após estímulo com NS3 em DCA, durante a defervescência, quando comparado com DSA durante o mesmo período (Fig. 14 A). No entanto, tais diferenças não parecem ser importantes diante do quadro geral de produção de citocinas por células T observado.

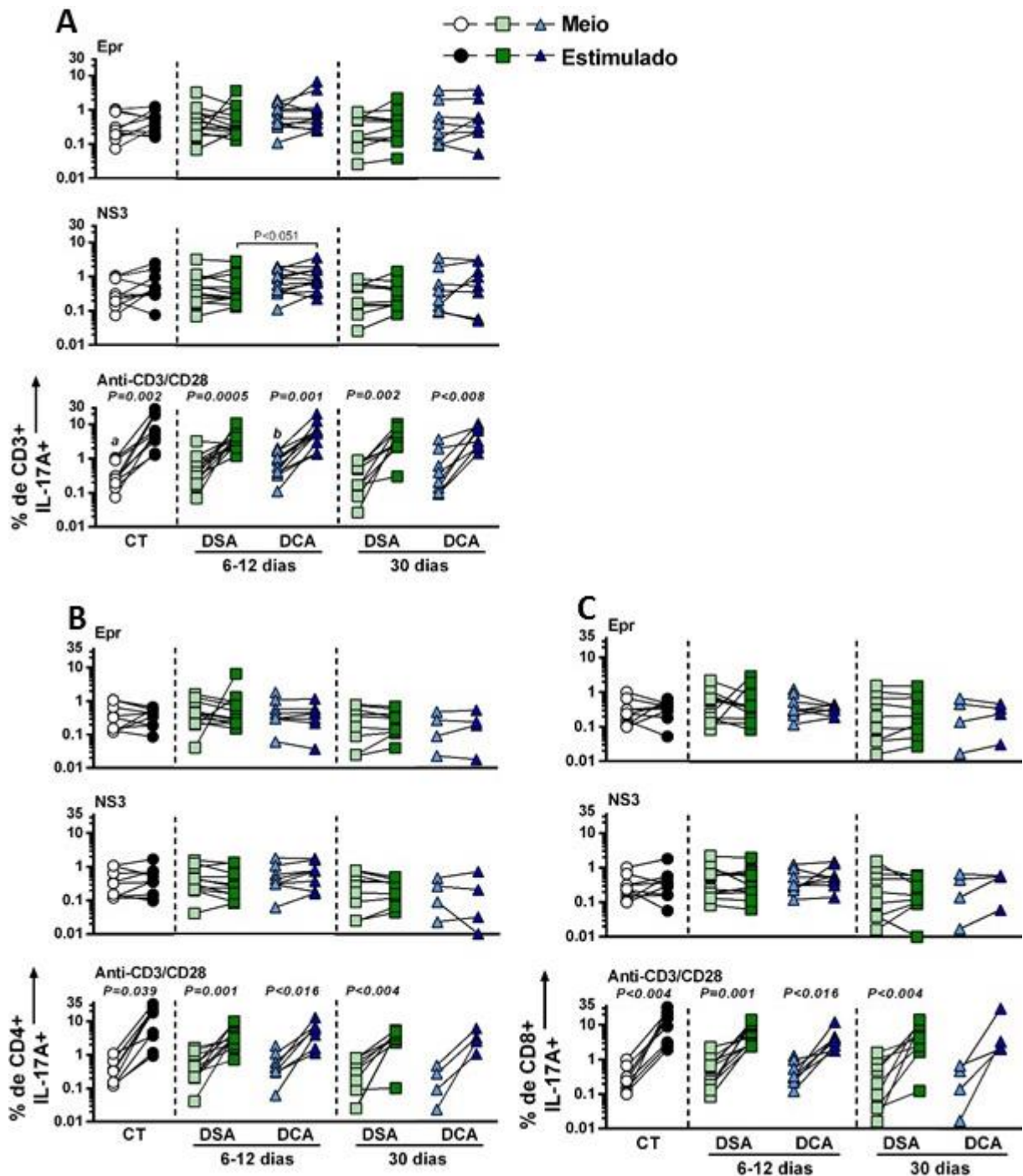


**Figura 12 – Produção de IL-2 por linfócitos T.** As PBMC provenientes de indivíduos Controle, DSA e DCA foram cultivadas por 10 horas em 4 condições distintas: apenas com Meio (círculo aberto, quadrado verde claro e triângulo azul claro), ou com adição de estímulos (círculo fechado, quadrado verde escuro e triângulo azul escuro) imunogênico (Epr ou NS3 - DENV1) ou policlonal (Anti-CD3 e Anti-CD28). Brefeldina A foi adicionada em todas as condições nas últimas 10 horas de cultura. Após o término da incubação, as células foram lavadas e submetidas a marcação com painel de anticorpos para de citometria de fluxo multiparamétrica como detalhado em Material e Métodos. Em (A) está representado a porcentagem de células  $CD3^+ViViD^-IL-2^+$ , Controle n=8, 6-12d DSA n=11 e DCA n=10; >30d DSA n=8 e DCA n=7, em (B) células  $CD3^+ViViD^-CD4^+CD8^-IL-2^+$ , Controle n=7, 6-12d DSA n=9 e DCA n=6, >30d DSA n=7 e DCA n=3; e em (C) células  $CD3^+ViViD^-CD4^+CD8^+IL-2^+$ , Controle n=7, 6-12d DSA n=9 e DCA n=6, >30d DSA n=7 e DCA n=3, em todos foi utilizado o Teste estatístico Wilcoxon. Letra *a* representa o grupo Controle e *b* os demais grupos quando a diferença entre eles é igual a  $p \leq 0,005$  segundo o Teste Mann-Whitney.



**Figura 13 – A infecção por dengue não induziu produção relevante de IL-4/IL-13 por linfócitos T específicos ao DENV1.** As PBMC provenientes de indivíduos Controle, DSA e DCA foram cultivadas por 10 horas em 4 condições distintas: apenas com Meio (círculo aberto, quadrado verde claro e triângulo azul claro), ou com adição de estímulos (círculo fechado, quadrado verde escuro e triângulo azul escuro) imunogênico (Epr ou NS3 - DENV1) ou policlonal (Anti-CD3 e Anti-CD28). Brefeldina A foi adicionada em todas as condições nas últimas 10 horas de cultura. Após o término da incubação, as células foram lavadas e submetidas a marcação com painel de anticorpos para de citometria de fluxo multiparamétrica como detalhado em Material e Métodos. Em (A) está representado a porcentagem de células  $CD3^+ViViD^-IL-4/IL-13^+$ , Controle  $n=10$ , 6-12d DSA  $n=13$  e DCA  $n=11$ , >30d DSA  $n=10$  e DCA  $n=8$ ; (B)  $CD3^+ViViD^-CD4^+CD8^-IL-4/IL-13^+$ , Controle  $n=9$ , 6-12d DSA  $n=11$  e DCA  $n=7$ , >30d DSA  $n=9$  e DCA  $n=4$ ; (C)  $CD3^+ViViD^-CD4^+CD8^+IL-4/IL-13^+$ , Controle  $n=9$ , 6-12d DSA  $n=11$  e DCA  $n=7$ , >30d DSA  $n=9$  e DCA  $n=4$ , em todos foi utilizado o Teste estatístico Wilcoxon.



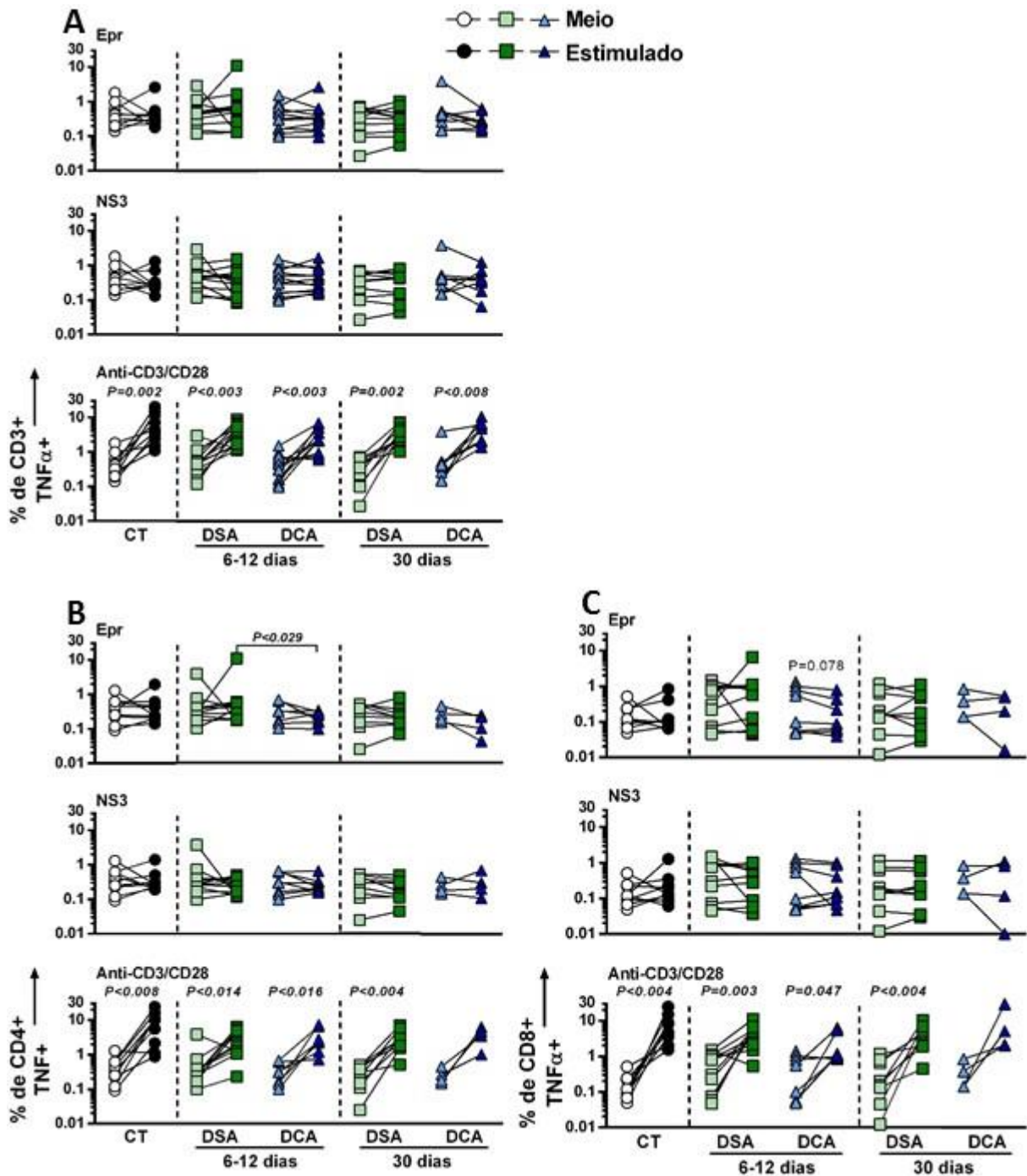


**Figura 14 – A infecção por dengue não induziu produção relevante de IL-17A por linfócitos T específicos ao DENV1.** As PBMC provenientes de indivíduos Controle, DSA e DCA foram cultivadas por 10 horas em 4 condições distintas: apenas com Meio (círculo aberto, quadrado verde claro e triângulo azul claro), ou com adição de estímulos (círculo fechado, quadrado verde escuro e triângulo azul escuro) imunogênico (Epr ou NS3 - DENV1) ou policlonal (Anti-CD3 e Anti-CD28). Brefeldina A foi adicionada em todas as condições nas últimas 10 horas de cultura. Após o término da incubação, as células foram lavadas e submetidas a marcação com painel de anticorpos para de citometria de fluxo multiparamétrica como detalhado em Material e Métodos. Em (A) está representado a percentagem de células CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup> IL-17<sup>+</sup>, Controle n=10, 6-12d DSA n=13 e DCA n=11, >30d DSA n=10 e DCA n=8; (B) CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> IL-17<sup>+</sup>, Controle n=9, 6-12d DSA n=11 e DCA n=7, >30d DSA n=9 e DCA n=4; e em (C) CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> Controle n=9, 6-12d DSA n=11 e DCA n=7, >30d DSA n=9 e DCA n=4, em todos foi utilizado o Teste estatístico Wilcoxon. Letra *a* representa o grupo Controle e *b* os demais grupos quando a diferença entre eles é igual a  $p \leq 0,005$  segundo o Teste Mann-Whitney.

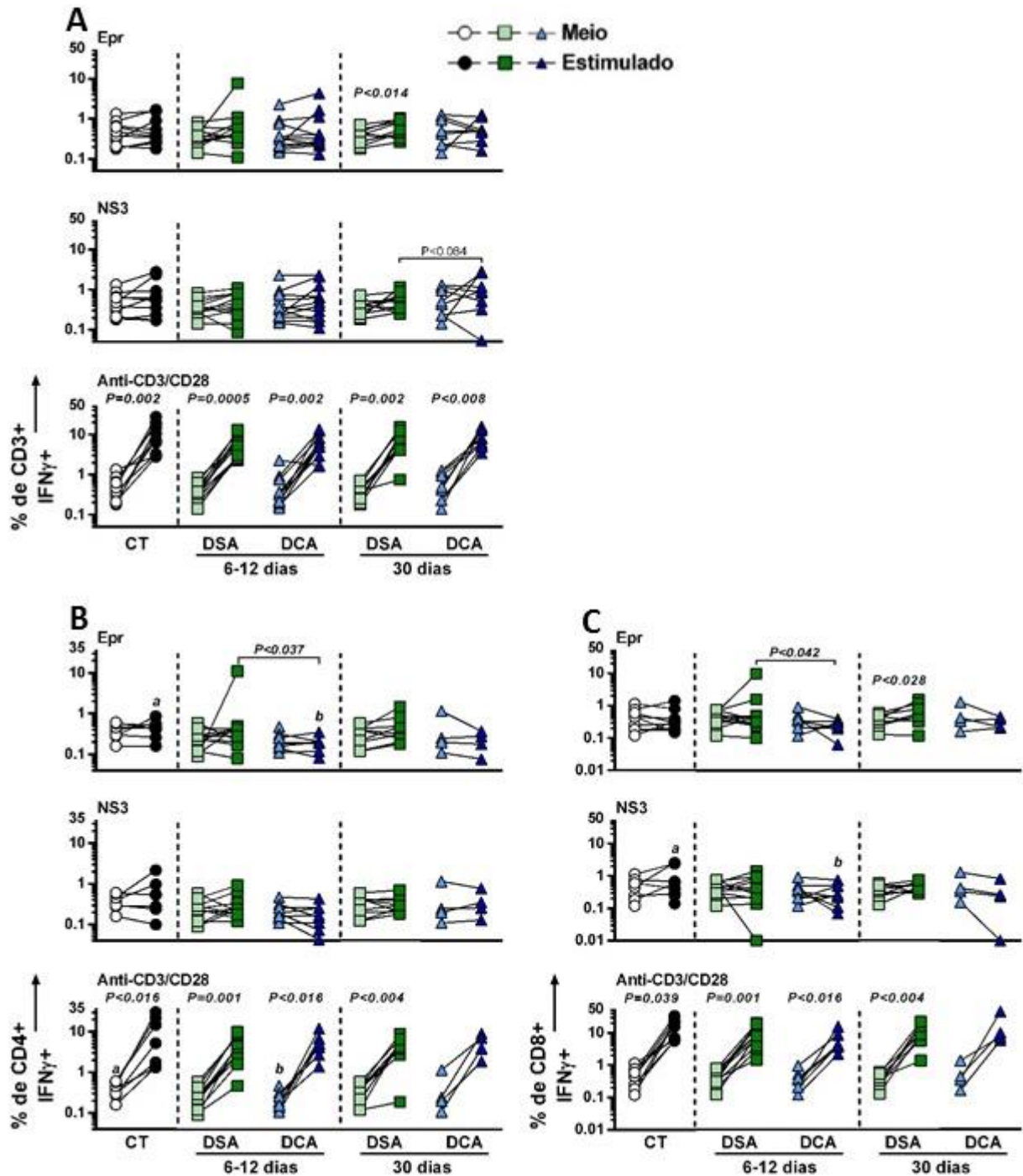
Por outro lado, ao avaliarmos a produção de  $\text{TNF}\alpha$  pelas células T, verificamos que DSA, 6-12 dias após o início dos sintomas, apresentaram produção significativamente maior de  $\text{TNF}\alpha^+$  por células T  $\text{CD4}^+$  na presença de Epr, comparado com DCA (Fig. 15 B). Foi observada redução na frequência das células T  $\text{CD8}^+\text{TNF}\alpha^+$  estimuladas com Epr em indivíduos com DCA na fase de defervescência (Fig. 15 C).

Indivíduos com DSA apresentaram produção aumentada de  $\text{IFN}\gamma$  pelas células T (Fig. 16). Houve um aumento significativo na frequência de células  $\text{CD3}^+\text{IFN}\gamma^+$  (Fig. 16 A) e  $\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+$  (Fig. 16 C) quando estimulados com Epr durante a convalescência de pacientes com DSA. Além disso, células T  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$  de indivíduos com DSA apresentaram níveis significativamente maiores de  $\text{IFN}\gamma$  após o estímulo específico quando comparados com células T  $\text{CD4}^+$  (Fig. 16 B) ou  $\text{CD8}^+$  (Fig. 16 C) de indivíduos com DCA. No período de convalescência, PBMC de indivíduos com DSA apresentam aumento da produção de  $\text{IFN}\gamma$  após o estímulo, o que não se observa em PBMC de indivíduos com DCA (Fig. 16 A e C), o que pode sugerir um defeito no desenvolvimento de células T antígeno-específicas nos casos mais graves.

Estes resultados sugerem que os indivíduos DSA montaram uma resposta inflamatória coerente com a resistência ao vírus e que surpreendentemente indivíduos com DCA não conseguiram estabelecer tal resposta durante a fase mais crítica da evolução clínica, o período de defervescência. Pelo contrário, a resposta de perfil Th1, necessária para a eliminação do vírus, parece estar suprimida neste grupo. Estes resultados sugerem, portanto, que uma produção eficiente de resposta Th1 favorece a melhor resolução clínica da doença.



**Figura 15** – Os pacientes DSA apresentaram produção de TNF $\alpha$  por linfócitos T específicos ao DENV1. As PBMC provenientes de indivíduos Controle, DSA e DCA foram cultivadas por 10 horas em 4 condições distintas: apenas com Meio (círculo aberto, quadrado verde claro e triângulo azul claro), ou com adição de estímulos (círculo fechado, quadrado verde escuro e triângulo azul escuro) imunogênico (Epr ou NS3 - DENV1) ou policlonal (Anti-CD3 e Anti-CD28). Brefeldina A foi adicionada em todas as condições nas últimas 10 horas de cultura. Após o término da incubação, as células foram lavadas e submetidas a marcação com painel de anticorpos para de citometria de fluxo multiparamétrica como detalhado em Material e Métodos. Em (A) está representado a porcentagem de células CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup>, Controle n=10, 6-12d DSA n=13 e DCA n=11, >30d DSA n=10 e DCA n=8; (B) CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup>, Controle n=9, 6-12d DSA n=11 e DCA n=7, >30d DSA n=9 e DCA n=4; e em (C) CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup>, Controle n=9, 6-12d DSA n=11 e DCA n=7, >30d DSA n=9 e DCA n=4, em todos foi utilizado o Teste estatístico Wilcoxon. Letra *a* representa o grupo Controle e *b* os demais grupos quando a diferença entre eles é igual a  $p \leq 0,005$  segundo o Teste Mann-Whitney.



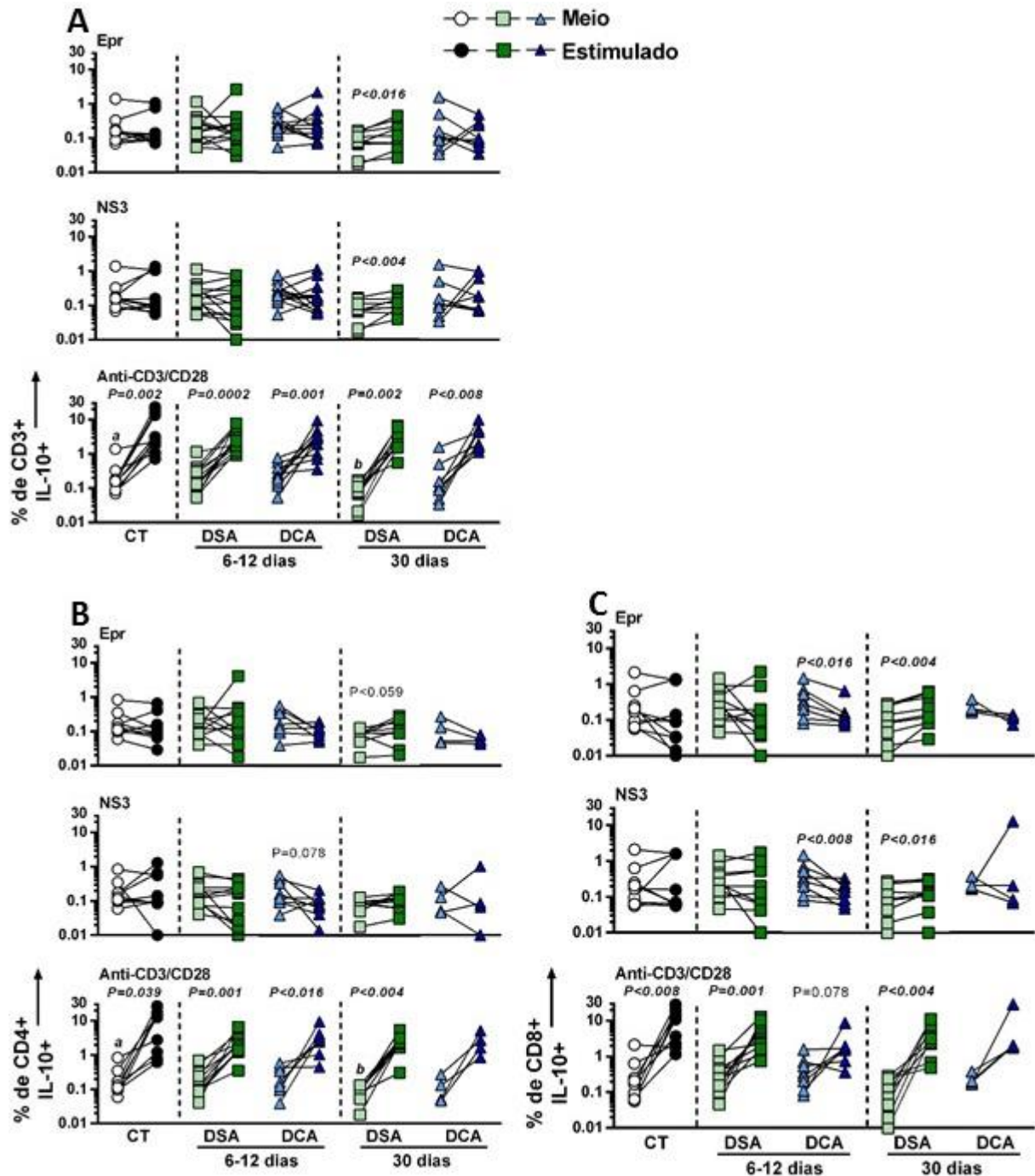
**Figura 16** – Os indivíduos DSA apresentaram produção de IFN $\gamma$  por linfócitos T específicos ao DENV1. As PBMC provenientes de indivíduos Controle, DSA e DCA foram cultivadas por 10 horas em 4 condições distintas: apenas com Meio (círculo aberto, quadrado verde claro e triângulo azul claro), ou com adição de estímulos (círculo fechado, quadrado verde escuro e triângulo azul escuro) imunogênico (Epr ou NS3 - DENV1) ou policlonal (Anti-CD3 e Anti-CD28). Brefeldina A foi adicionada em todas as condições nas últimas 10 horas de cultura. Após o término da incubação, as células foram lavadas e submetidas a marcação com painel de anticorpos para de citometria de fluxo multiparamétrica como detalhado em Material e Métodos. Em (A) está representado a percentagem de células CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, Controle n=10, 6-12d DSA n=12 e DCA n=11, >30d DSA n=10 e DCA n=8; (B) CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, Controle n=7, 6-12d DSA n=11 e DCA n=7, >30d DSA n=9 e DCA n=4; e (C) CD3<sup>+</sup>ViViD<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, Controle n=9, 6-12d DSA n=11 e DCA n=7, >30d DSA n=9 e DCA n=4, em todos foi utilizado o Teste estatístico Wilcoxon. Letra *a* representa o grupo Controle e *b* os demais grupos quando a diferença entre eles é igual a  $p \leq 0,005$  segundo o Teste Mann-Whitney.

### *5.3 Indivíduos com DSA apresentaram elevada produção de IL-10 por linfócitos T específicos ao DENV1*

A citocina anti-inflamatória IL-10 tem como função regular as respostas imunes inata e adaptativa. Tendo em vista que a hiperativação imune ocorre na dengue, torna-se de extrema relevância mensurar a produção desta citocina por células T específicas ao vírus, a fim de compreender melhor a imunopatologia da dengue grave.

Verificamos que houve um aumento na frequência das células T CD3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> específicas em indivíduos com DSA durante a convalescência (Fig. 17 A). Esse aumento deve-se tanto às células T CD4<sup>+</sup> quanto à população de células T CD8<sup>+</sup>, especialmente quando estimuladas com Epr (Fig. 17 B e C). Curiosamente, o grupo com DCA, por sua vez, parece apresentar uma regulação negativa da produção de IL-10 quanto exposto ao antígeno específico (Fig. 17 B e C) apresentando, assim, um perfil oposto ao do grupo com DSA.

Estes dados sugerem que pode haver um papel da produção de IL-10 por linfócitos T específicos ao vírus dengue na evolução inflamatória que medeia um combate eficiente viral e contribui para a melhor evolução clínica da doença.



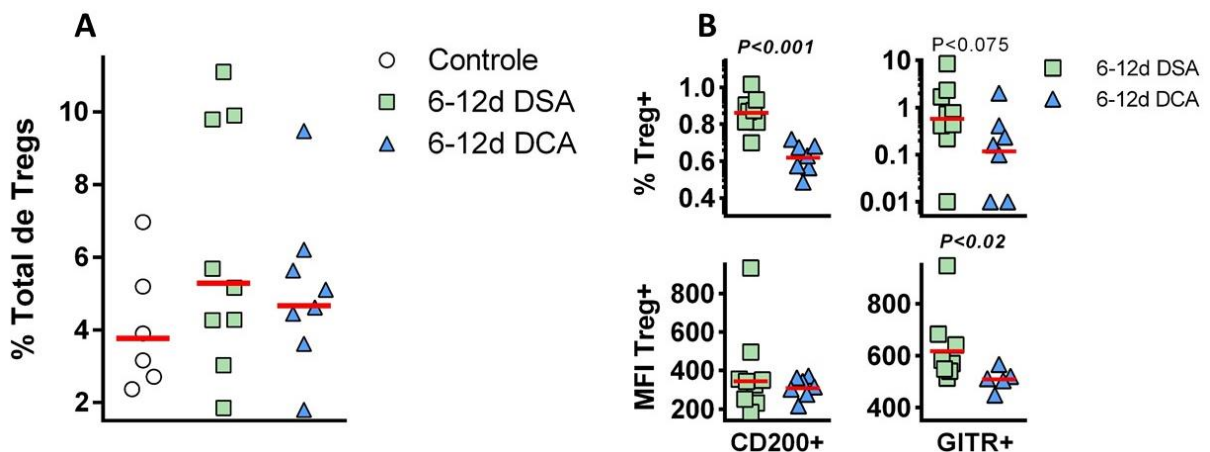
**Figura 17 – Os indivíduos DSA apresentaram elevada produção de IL-10 por linfócitos T específicos ao DENV1.** As PBMC provenientes de indivíduos Controle, DSA e DCA foram cultivadas por 10 horas em 4 condições distintas: apenas com Meio (círculo aberto, quadrado verde claro e triângulo azul claro), ou com adição de estímulos (círculo fechado, quadrado verde escuro e triângulo azul escuro) imunogênico (Epr ou NS3 - DENV1) ou policlonal (Anti-CD3 e Anti-CD28). Brefeldina A foi adicionada em todas as condições nas últimas 10 horas de cultura. Após o término da incubação, as células foram lavadas e submetidas a marcação com painel de anticorpos para de citometria de fluxo multiparamétrica como detalhado em Material e Métodos. Em (A) está representado a percentagem de células  $CD3^+ViViD^-IL-10^+$ , Controle  $n=10$ , 6-12d DSA  $n=13$  e DCA  $n=11$ , >30d DSA  $n=10$  e DCA  $n=8$ ; em (B) células  $CD3^+ViViD^-CD4^+CD8^-IL-10^+$  Controle  $n=9$ , 6-12d DSA  $n=11$  e DCA  $n=7$ , >30d DSA  $n=9$  e DCA  $n=4$ ; e em (C) células  $CD3^+ViViD^-CD4^-CD8^+IL-10^+$ , Controle  $n=7$ , 6-12d DSA  $n=11$  e DCA  $n=7$ , >30d DSA  $n=9$  e DCA  $n=4$ , em todos foi utilizado o Teste estatístico Wilcoxon. Letra *a* representa o grupo Controle e *b* os demais grupos quando a diferença entre eles é igual a  $p \leq 0,005$  segundo o Teste Mann-Whitney.

#### 5.4 Indivíduos com DSA apresentaram elevada frequência de células Tregs produzindo IL-10 e expressando CD200 e GITR

Para melhor compreender como é realizado o controle da inflamação na infecção por dengue, nós estudamos o fenótipo das células Tregs ( $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}FoxP3^+$ ) nas diferentes formas clínicas da Dengue Humana.

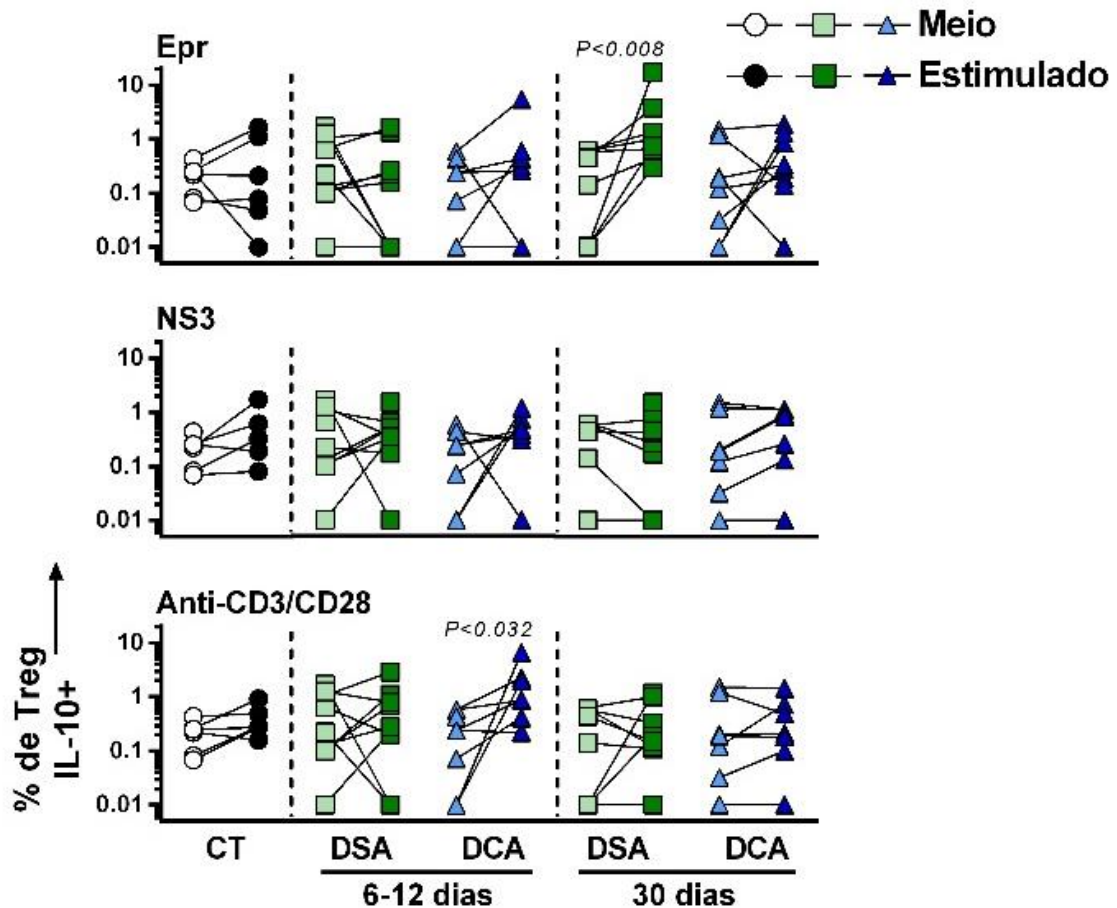
A frequência total de células Tregs foi similar no grupo Controle e os indivíduos com dengue (Fig. 18 A). Também não encontramos diferenças na frequência e na intensidade da expressão das moléculas regulatórias LAP e PD-1 em células Tregs dos grupos avaliados (dados não apresentados).

No entanto, ao analisar a frequência de células Tregs expressando as moléculas regulatórias CD200 e GITR, observamos percentagens significativamente maiores nos indivíduos com DSA durante a defervescência quando comparados aos pacientes com DCA. Além disso, a Intensidade Média de Fluorescência (MFI – Media Intensity Fluorescence) da molécula GITR nas Tregs do grupo DSA é significativamente maior com relação ao DCA (Fig. 18 B). No período de convalescência, ambos os marcadores retornam aos níveis basais (dados não mostrados).



**Figura 18 – Os indivíduos DSA apresentaram elevada frequência de células Tregs expressando CD200 e GITR.** Frequência Total de células Tregs em indivíduos Controle (círculo aberto), durante a defervescência de DSA (quadrado verde claro) e DCA (triângulo azul escuro), Controle n=6, 6-12d DSA n=9 e DCA n=8 (A). Frequência e MFI de Tregs expressando CD200 e GITR, 6-12d DSA n=9 e DCA n=7 (exceto MFI de Tregs GITR 6-12d DSA n=8 e DCA n=5) (B). As linhas vermelhas representam a Média Geométrica. Teste estatístico Mann-Whitney.

Além disso, quando as células Treg foram avaliadas quanto à sua capacidade de produção de IL-10, encontramos um aumento significativo na frequência de células Treg específicas à proteína do Envelope viral (Epr) produtoras de IL-10 nos indivíduos DSA durante a convalescência (Fig. 19).



**Figura 19 – As células Tregs provenientes dos indivíduos DSA produzem IL-10 em resposta ao estímulo imunogênico.** As PBMC provenientes de indivíduos Controle, DSA e DCA foram cultivadas por 10 horas em 4 condições distintas: apenas com Meio (círculo aberto, quadrado verde claro e triângulo azul claro), ou com adição de estímulos (círculo fechado, quadrado verde escuro e triângulo azul escuro) imunogênico (Epr ou NS3 - DENV1) ou policlonal (Anti-CD3 e Anti-CD28). Brefeldina A foi adicionada em todas as condições nas últimas 10 horas de cultura. Após o término da incubação, as células foram lavadas e submetidas a marcação com painel de anticorpos para de citometria de fluxo multiparamétrica como detalhado em Material e Métodos. Após o término de incubação, as células foram lavadas e seguiu com o processo de marcação de citometria de fluxo multiparamétrica para caracterização das células Treg produtoras de IL-10 ( $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^+$ ). Controle n=6, 6-12d DSA n=9 e DCA n=7, >30d DSA n=8 e DCA n=8. Teste estatístico Wilcoxon.

Estes resultados sugerem uma associação entre a elevada frequência de células Treg expressando CD200 e GITR, que medeiam o controle da resposta imune inata e adaptativa, respectivamente, e Treg específicas ao DENV1 produzindo IL-10, e uma evolução clínica favorável.



## 6. DISCUSSÃO

A resolução das infecções causadas por vírus como dengue, West Nile, influenza, entre outros, são bastante variáveis. É possível encontrar indivíduos que desenvolvam uma doença assintomática ou infecção subclínica, bem como uma pequena minoria das pessoas que desenvolvem doenças mais graves que podem ser letais (Rouse e Sehrawat, 2010). Muitos estudos buscam compreender melhor a patologia encontrada na DG. Já se sabe que uma infecção primária confere proteção por um longo período ao sorotipo homólogo (Mathew e 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 viremia elevada, fenômeno conhecido como ADE, e conseqüentemente a produção exacerbada de citocinas pelas células da imunidade inatas 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 *naive* durante a infecção secundária heterotípica aguda. Entretanto, estes linfócitos de memória não possuem uma ótima avidéz aos epítomos correspondentes ao novo vírus, e por existir uma certa preferência na ativação de células de memória em comparação às *naive*, a resposta que será montada não será a mais adequada para eliminar o novo sorotipo viral, e pode também levar a uma Tempestade de Citocinas ainda mais intensa (Zompi e Harris, 2013).

Estudiosos acreditam que a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias podem apresentar um papel importante na permeabilidade vascular, como no trabalho de (Rothman, 2011), que demonstrou que os pacientes com FHD possuem elevados níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias e vasoativos tanto antes quanto durante o momento do extravasamento plasmático, e o grau de elevação destas citocinas se correlaciona com a gravidade da doença (Bethell, Flobbe, Cao, *et al.*, 1998; Green, Vaughn, Kalayanarooj, *et al.*, 1999b; Bozza, Cruz, Zagne, *et al.*, 2008). Outras infecções, como as causadas pelo vírus da gripe e o hantavírus, também são caracterizadas pela Tempestade de Citocinas, em que a ativação imune é extensiva e cria uma cascata de produção de citocinas, o que resulta em um aumento da permeabilidade vascular (Rothman, 2011).

De forma interessante, ao avaliarmos o perfil de citocinas inflamatórias circulante em indivíduos acometidos por dengue, encontramos que os indivíduos com DCA desenvolveram uma resposta inflamatória escassa. Apesar de encontrarmos um aumento nos níveis de IL-8 e uma tendência no aumento de IL-6, observamos que os indivíduos com DCA, durante a defervescência, apresentaram níveis significativamente menores de IL-12p70, TNF, IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-17A quando comparados aos indivíduos dos grupos Controle e DSA. Porém, no grupo com DSA, observamos um aumento nos níveis de IL-8, IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-6. Este pico de produção de citocinas coincide com a tão extensivamente relatada Tempestade de Citocinas (Mathew e Rothman, 2008), embora as evidências em nossos dados apontam para níveis inflamatórios maiores em pacientes com DSA. Acreditamos, entretanto, que diferenças ainda maiores podem estar ocorrendo nos tecidos e, de certa forma, os níveis sistêmicos podem ser 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 vírus na pele durante a infecção por dengue (Rivino, Kumaran, Thein, *et al.*, 2015). Surpreendentemente, a Tempestade de Citocinas foi menor nos indivíduos DCA e, portanto, não justifica a gravidade do quadro clínico dos indivíduos DSA.

É importante ressaltar que as complicações encontradas em DCA e DG, como extravasamento plasmático grave, se iniciam quando a viremia está em resolução, simultaneamente com a forte resposta dos linfócitos T, o que implica na produção de elevados níveis de citocinas inflamatórias (Dejnirattisai *et al.*, 2008). Estas observações indicam que o DENV não é o único e nem o grande responsável pela patologia encontrada na dengue, bem como o fenômeno do ADE, pois a viremia causada pelo ADE já estaria controlada. Assim, estes achados sugerem que a imunopatologia encontrada em sujeitos com DG pode estar sendo mediada diretamente pela resposta do hospedeiro.

A ativação dos linfócitos é essencial na resistência à infecção. Alguns trabalhos mostraram que os indivíduos com FHD apresentaram níveis elevados de formas solúveis de moléculas presentes nas células T, como CD4 solúvel, CD8 solúvel e o receptor de IL-2, que são indicativos da ativação de células T (Kurane, Innis, Nimmannitya, N *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1999b; Rothman, 2011). Outro estudo também relatou maior ativação das células T, determinada pela expressão de CD69, no sangue periférico de pacientes com FHD comparado aos que apresentavam febre da dengue (Green, Pichyangkul, Vaughn, *et al.*, 1999). O aumento da ativação dos linfócitos T, bem como a produção de citocinas, tem sido relatado nos sujeitos

com FHD tanto durante a infecção primária, quanto na secundária (Green *et al.*, 1999b; Rothman, 2011).

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 Th0, ou seja, produção principalmente de IFN $\gamma$ , TNF, IL-2 e CCL4, e menos comumente das citocinas de perfil Th2 como IL-4 (Mangada e Rothman, 2005; Imrie *et al.*, 2007). Em nosso trabalho encontramos que os indivíduos classificados como DSA apresentaram produção de citocinas predominantemente de perfil Th1 pelos linfócitos específicos ao vírus dengue.

As citocinas produzidas por estas células T podem apresentar múltiplos efeitos sobre as células, como a indução ou melhoria da inflamação e a alteração da permeabilidade vascular. As citocinas IL-2 ou TNF podem agir diretamente sobre as células endoteliais vasculares e induzir o extravasamento vascular sistêmico (Pang, Cardoso e Guzman, 2007). Células T oriundas de indivíduos hospitalizados com dengue produzem TNF em resposta à estimulação com antígenos do vírus da dengue, o que sugere que as células T podem estar participando na patogênese da dengue e contribuindo para a maior gravidade clínica da doença (Mangada, Endy, Nisalak, *et al.*, 2002). Com relação à citocina IL-2, observamos um aumento substancial na produção desta citocina por linfócitos T específicos ao DENV dos indivíduos DCA durante a defervescência. Por outro lado, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos ao vírus proveniente dos pacientes com DSA durante a defervescência produziram níveis significativamente maiores de TNF $\alpha$  comparado a indivíduos com DCA. Estes resultados sugerem que apesar desta citocina ser considerada importante vasodilatador, outro mecanismo deve estar atuando em conjunto com sua presença, já que encontramos níveis significativos de TNF no grupo de DSA, que evolui sem complicações e sem sinais de extravasamento plasmático. Além disso, nossos resultados são semelhantes aos encontrados por (Hatch *et al.*, 2011) e (Mathew, Townsley e Ennis, 2014), que relataram altos níveis de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de citocinas TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  em pacientes com melhor prognóstico à infecção pelo vírus dengue.

Os nossos resultados mostram que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicos ao DENV, oriundo de indivíduos com DSA durante a defervescência, produzem níveis significativamente maiores de IFN $\gamma$  com relação a DCA. Estes resultados demonstraram que os indivíduos classificados como DSA estão inflamados principalmente durante o período mais crítico da evolução clínica, e surpreendentemente o mesmo não foi observado para DCA. A resposta de

perfil Th1, necessária para a eliminação do vírus, parece estar suprimida no grupo com DCA, o que sugere que uma produção mais adequada de resposta Th1 e favorece a melhor resolução clínica da doença.

Além de uma resposta inflamatória eficiente, os pacientes com DSA também apresentaram um adequado perfil regulatório, inclusive com a produção de IL-10. A citocina anti-inflamatória IL-10 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 e Riley, 2008). As atividades da IL-10 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- $\kappa$ B, suprimindo a transdução de sinal de IFN do tipo I, inibindo a expressão de MHC-II, entre outras ações (Moore, Malefyt, Coffman *et al.*, 2001).

A quantidade de IL-10 que é produzida durante uma infecção pode influenciar a magnitude de danos teciduais. Portanto, se a resposta de IL-10 for ausente ou estiver suprimida, as reações inflamatórias contra os agentes infecciosos poderão ser exageradas. O trabalho de (Sun, Madan, Karp *et al.*, 2009) demonstrou que durante uma infecção aguda de camundongos por influenza, a produção de IL-10 por células T efetoras específicas ao vírus influenza, minimizou a severidade das lesões pulmonares (Sun, Madan, Karp *et al.*, 2009). A atividade protetora da IL-10 também pode ser observada durante as infecções crônicas, como HCV e HIV, nas quais, a função anti-inflamatória da IL-10 contém a gravidade das reações inflamatórias (Mangia, Santoro, Piattelli, *et al.*, 2004; Brockman, Kwon, Tighe, *et al.*, 2009; Naicker, Werner, Kormuth, *et al.*, 2009). A importância da IL-10 para uma evolução favorável de um processo infeccioso também já foi demonstrada para outras infecções, como as causadas por protozoários. Um trabalho recente em malária e leishmaniose visceral identificou uma via de regulação da patologia mediada por TNF por meio da produção de IL-10, de um modo dependente de Blimp-1, pelas células Tr1 (Th1 produtoras de IL-10) (Montes de Oca, Kumar, de Labastida Rivera, *et al.*, 2016). Outro estudo demonstrou que camundongos que controlam a infecção aguda por *Trypanosoma cruzi* apresentaram uma frequência elevada de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN $\gamma$  e IL-10 (Roffe, Rothfuchs, Santiago, *et al.*, 2012).

Os nossos resultados mostram claramente um aumento significativo na produção de IL-10 pelos linfócitos T específicos ao DENV dos indivíduos classificados como DSA durante a fase de convalescência, que sugere, em concordância com os trabalhos citados acima, que os

pacientes DSA estão controlando as respostas pró-inflamatórias, contribuindo para a melhor evolução clínica da doença. Além disso, a produção da IL-10 encontrada no grupo DSA pode ser observada tanto pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto pelos T CD8<sup>+</sup> específicos ao vírus. Outros trabalhos também já haviam demonstrado esta plasticidade das células CD8<sup>+</sup> em produzir a citocina anti-inflamatória IL-10. Células T CD8<sup>+</sup> oriundas de indivíduos com HIV produzem IL-10 e suprimem a produção de IL-2 (Elrefaei, Ventura, Baker, *et al.*, 2007).

Por outro lado, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos sujeitos com DCA, durante a fase mais crítica da evolução clínica, ou seja, na defervescência, parecem apresentar uma regulação negativa da produção de IL-10 quando expostos ao antígeno específico. Desta forma, este perfil é oposto ao do grupo com DSA. Este resultado sugere que as complicações observadas durante a evolução clínica dos pacientes classificados como DCA podem estar associadas à falta de controle da resposta inflamatória que contribui para a imunopatologia. Outros estudos também relatam que a ausência da sinalização de IL-10 pode impedir o controle das respostas inflamatórias, e conseqüentemente contribuir para apresentações clínicas mais graves. Por exemplo, a falta de IL-10 resulta em reações inflamatórias mais graves durante a infecção ocular pelo vírus herpes simples em modelo experimental (Sarangi, Sehrawat, Suvas e Rouse, 2008). Além disso, a supressão da resposta de IL-10 por células T efetoras parece contribuir para o aumento de virulência das cepas de H1N1 e H5N5 (Kobasa, Jones, Shinya, *et al.*, 2007).

Como já mencionamos, várias células podem produzir IL-10. Nossos resultados demonstraram altos níveis de IL-10 circulante em ambos os grupos de DSA e DCA, tanto na fase febril quanto na defervescência. Entretanto, a origem da IL-10 parece ser diferente entre estes grupos. Nossos dados indicam que a IL-10 provém da resposta imune adaptativa nos indivíduos DSA, enquanto que a fonte provável da IL-10 para os sujeitos com DCA parece ser o sistema inato, já que não encontramos produção de IL-10 pelos linfócitos T destes pacientes. Pelo contrário, como já mencionado acima, ocorre uma diminuição significativa da produção de IL-10 pelos linfócitos T em resposta ao estímulo específico. Outros trabalhos também demonstraram a presença da IL-10 em diferentes fases da dengue (Green, Vaughn, Kalayanarooj, *et al.*, 1999; Pandey, Jain, Garg, *et al.*, 2015). Isto pode ser reflexo das distintas fontes dessa citocina, incluindo macrófagos durante a fase inicial e as células T reguladoras (Tregs), que são uma das principais fontes de IL-10 no compartimento adaptativo.

Dentre as grandes fontes de IL-10 do sistema imunológico, podemos 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 e 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 Treg suprimem a proliferação de células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-6, por meio de dois mecanismos principais: liberação de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- $\beta$  e, especialmente, IL-10, e, como mencionado anteriormente, por meio da interação de moléculas regulatórias, tais como CD200, GITR, CTLA-4, LAP e PD-1, expressos nas Tregs, com seus respectivos receptores presentes nas APCs e células T efetoras (Belkaid e Tarbell, 2009) e (Josefowicz, Lu e Rudensky, 2012).

Alguns trabalhos fornecem evidências convincentes para o papel de células Tregs expressando FoxP3 em um largo número de infecções experimentais e em humanos (Belkaid e 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, Azkur, Kim, Kumaraguru e Rouse, 2004). Em outro estudo, foi demonstrado que os indivíduos infectados com WNV que desenvolvem uma doença sintomática, com cefaleia, mialgia, fraqueza, febre e dor retro-orbitária, apresentam baixa frequência de Tregs quando comparados com os indivíduos assintomáticos. Utilizando-se modelo experimental, foi demonstrado que camundongos sintomáticos infectados com WNV também desenvolvem menor frequência de Tregs e que os camundongos deficientes de Tregs desenvolvem infecção letal (Lanteri, O'brien, Purtha, *et al.*, 2009). Outros trabalhos demonstraram que o aumento da proporção de Tregs limitou as reações imunopatológicas induzidas pela infecção por HSV (Sehrawat e Rouse, 2008; Sehrawat, Suvas, Sarangi, *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 DSA e DCA (Luhn *et al.*, 2007). Entretanto, Lühn, K; et al 2007 observaram que o grupo DSA apresentou aumento relativo na razão de células Tregs por células T efetoras, e que uma maior presença relativa de Tregs se associa à evolução da doença (Luhn *et al.*, 2007).

Entretanto, apenas observar a frequência de 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, King, Prayther, *et al.*, 2007) ou mesmo os IFNs induzidos por vírus (Maier, Isogawa, Freeman *et al.*, 2007) apresentam um papel nessa indução (Boasso, Hardy, Landay, *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 e Sehrawat, 2010). O presente trabalho é o primeiro a demonstrar um aumento significativo nas populações de Treg CD200<sup>+</sup> e Treg GITR<sup>+</sup> em indivíduos com DSA. 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, Rygiel, Raaben, *et al.*, 2012). Por outro lado, a molécula GITR é importante no desenvolvimento das células Tregs e na regulação da resposta Th1 (Snell, Mcpherson, Lin, *et al.*, 2010).

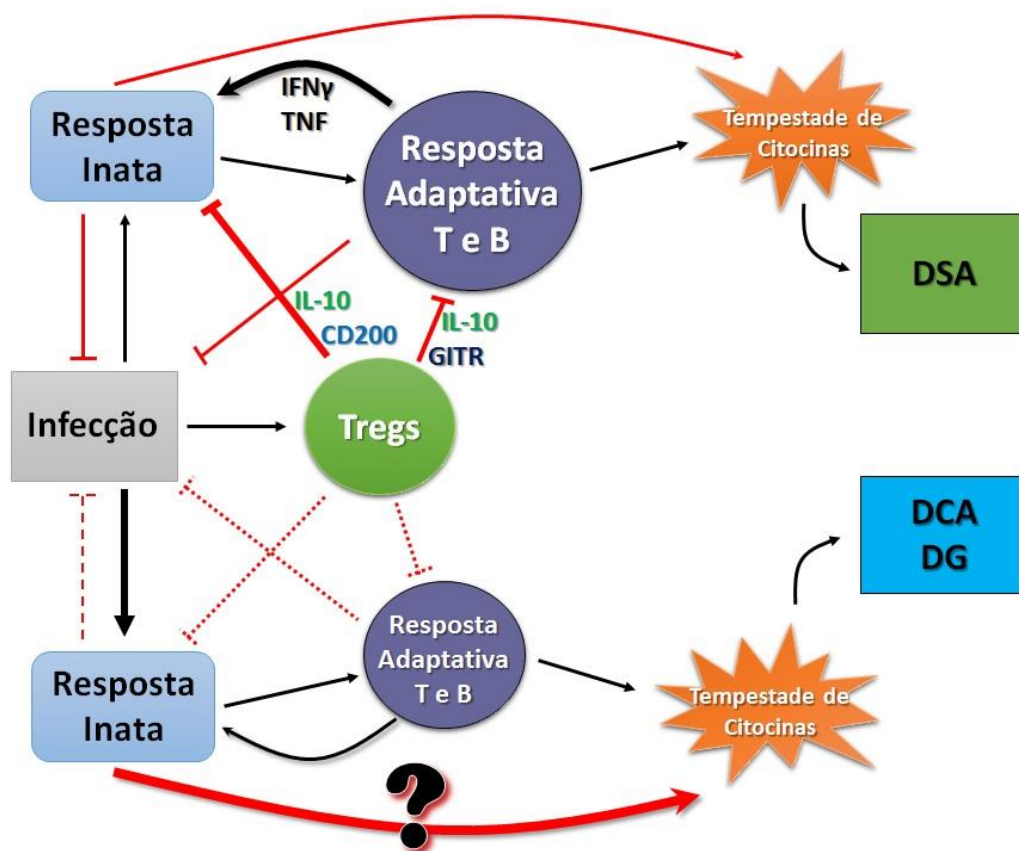
Por fim, estudos mostram que as células Tregs possuem um papel benéfico tanto na resolução de infecções virais crônicas – como a causada pelo HCV, que apresenta elevada produção de IL-10 por Tregs (Macdonald, Duffy, Brady, *et al.*, 2002), quanto de infecções agudas, como as causadas por protozoários (Roffe *et al.*, 2012; Montes De Oca *et al.*, 2016). Em nosso trabalho, ao avaliarmos a produção de IL-10 pelas células Tregs, encontramos um aumento significativo na frequência de Treg específicas ao vírus produtoras de IL-10, porém apenas nos indivíduos DSA durante a convalescência.

Os resultados encontrados sugerem uma associação entre a frequência elevada de células Tregs expressando CD200 e GITR, que medeiam respectivamente o controle da resposta imune inata e adaptativa, Tregs específicas ao DENV1 produzindo IL-10, e um melhor prognóstico da doença. Esses resultados levaram-nos a elaborar uma nova hipótese para abordar a resposta mais eficiente à infecção pelo vírus Dengue (Fig. 20).

Inicialmente, a presença do vírus induz a ativação da resposta imune inata, a fim de eliminar a infecção. Em seguida, as células T e B são ativadas e combatem a infecção diretamente e estimulando ainda mais a resposta inata através da produção de citocinas. Porém, como mencionado neste trabalho, a ativação exacerbada das respostas inata ou adaptativa pode desencadear a Tempestade de Citocinas, causando as manifestações clínicas da doença.

Nossos dados indicam que os indivíduos DSA são capazes de orquestrar uma resposta eficiente para a eliminação da infecção, por meio da ativação de linfócitos T específicos contra os vírus dengue produtores das citocinas IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ . Além disso, é observada a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-6 durante a fase inicial que se estende ao longo do curso da doença, e que possivelmente são provenientes do compartimento imune inato.

Portanto, estas respostas inflamatórias encontradas nos pacientes com DSA parecem estar adequadamente combatendo a infecção viral da dengue. E ainda, nós hipotetizamos que as células Tregs dos indivíduos com DSA estão controlando a resposta inata por meio da liberação de IL-10 e da expressão das moléculas regulatórias, como CD200, bem como a resposta adaptativa, pela produção de IL-10 e da expressão de moléculas regulatórias como GITR, levando então a um melhor prognóstico da doença.



**Figura 20.** Nova hipótese para explicar a origem da patogênese em Dengue. Desenho esquemático que sumariza os resultados encontrados neste trabalho.

Entretanto, as células Tregs provenientes dos indivíduos com DCA parecem estar comprometidas funcionalmente, perdendo a habilidade de controlar as respostas inflamatórias provenientes da imunidade inata e adaptativa. Surpreendentemente, não detectamos citocinas inflamatórias do compartimento adaptativo dos pacientes com DCA, apesar de encontrarmos um aumento de citocinas na circulação periférica. No entanto, como já descrito neste trabalho, é amplamente aceito o conceito de que a Tempestade de Citocinas esteja causando a patologia



encontrada na DG, o que nos leva a questionar: quais são as fontes celulares dessas citocinas? Acreditamos que mesmo níveis menores de citocinas pró-inflamatórias circulantes possam ter uma ação devastadora nos tecidos (onde podem ser encontrados em maiores concentrações) caso não estejam presentes mecanismos regulatórios. Sabemos que nossos métodos possuem algumas limitações, como por exemplo, a avaliação dos tecidos dos indivíduos acometidos por dengue, e que talvez seja o local onde a Tempestade de Citocinas esteja mais pronunciada.

## 7. CONCLUSÕES

As células T específicas ao vírus Dengue e oriundas dos indivíduos que apresentam DSA produzem citocinas de perfil pró-inflamatório como IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ . Surpreendentemente, o mesmo não foi observado nos pacientes com dengue com sinais de alarme. Houve produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por células T específicas ao vírus Dengue provenientes apenas dos pacientes DSA.

A presença das células Tregs CD200<sup>+</sup> e Tregs GITR<sup>+</sup> provenientes dos indivíduos DSA é significativamente maior quando comparado ao grupo DCA. De forma importante, foi observado que os indivíduos com DSA possuem células Tregs específicas ao vírus Dengue capazes de produzir IL-10.

Estes resultados sugerem que a resposta pró-inflamatória de perfil Th1 somado à presença de um mecanismo regulador, proporcionado pelas células Tregs e encontrado nos indivíduos com DSA efetivamente contribuem para a resolução apropriada da infecção, levando à melhor evolução clínica da doença.

## REFERÊNCIAS

- AUSTIN, S. K.; DOWD, K. A.; SHRESTHA, B.; NELSON, C. A.; EDELING, M. A.; JOHNSON, S.; PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H. Structural basis of differential neutralization of DENV1 genotypes by an antibody that recognizes a cryptic epitope. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 10, p. e1002930, 2012.
- BARCLAY, A. N.; WRIGHT, G. J.; BROOKE, G.; BROWN, M. H. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. **Trends Immunol**, v. 23, n. 6, p. 285-90, 2002.
- BARTENSCHLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 155-165, 2008.
- BEDOYA, F.; CHENG, G. S.; LEIBOW, A.; ZAKHARY, N.; WEISSLER, K.; GARCIA, V.; AITKEN, M.; KROPF, E.; GARLICK, D. S.; WHERRY, E. J.; ERIKSON, J.; CATON, A. J. Viral antigen induces differentiation of Foxp3<sup>+</sup> natural regulatory T cells in influenza virus-infected mice. **J Immunol**, v. 190, n. 12, p. 6115-25, 2013.
- BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol**, v. 6, n. 4, p. 353-60, 2005.
- BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 551-89, 2009.
- BELTRAMELLO, M.; WILLIAMS, K. L.; SIMMONS, C. P.; MACAGNO, A.; SIMONELLI, L.; QUYEN, N. T.; SUKUPOLVI-PETTY, S.; NAVARRO-SANCHEZ, E.; YOUNG, P. R.; DE SILVA, A. M.; REY, F. A.; VARANI, L.; WHITEHEAD, S. S.; DIAMOND, M. S.; HARRIS, E.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 3, p. 271-83, 2010.
- BETHELL, D. B.; FLOBBE, K.; CAO, X. T.; DAY, N. P.; PHAM, T. P.; BUURMAN, W. A.; CARDOSA, M. J.; WHITE, N. J.; KWIATKOWSKI, D. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, v. 177, n. 3, p. 778-82, 1998.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-7, 2013.
- BILATE, A. M.; LAFAILLE, J. J. Can TNF-alpha boost regulatory T cells? **J Clin Invest**, v. 120, n. 12, p. 4190-2, 2010.
- BOASSO, A.; HARDY, A. W.; LANDAY, A. L.; MARTINSON, J. L.; ANDERSON, S. A.; DOLAN, M. J.; CLERICI, M.; SHEARER, G. M. PDL-1 upregulation on monocytes and T cells by HIV via type I interferon: restricted expression of type I interferon receptor by CCR5-expressing leukocytes. **Clin Immunol**, v. 129, n. 1, p. 132-44, 2008.
- BOZZA, F. A.; CRUZ, O. G.; ZAGNE, S. M.; AZEREDO, E. L.; NOGUEIRA, R. M.; ASSIS, E. F.; BOZZA, P. T.; KUBELKA, C. F. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. **BMC Infect Dis**, v. 8, p. 86, 2008.

BRASIL, M. D. S. Dengue : diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. v. 4, 2011.

BROCKMAN, M. A.; KWON, D. S.; TIGHE, D. P.; PAVLIK, D. F.; ROSATO, P. C.; SELA, J.; PORICHIS, F.; LE GALL, S.; WARING, M. T.; MOSS, K.; JESSEN, H.; PEREYRA, F.; KAVANAGH, D. G.; WALKER, B. D.; KAUFMANN, D. E. 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. 346-56, 2009.

CAMPBELL, D. J. Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. **J Immunol**, v. 195, n. 6, p. 2507-13, 2015.

CHAN, K. R.; ZHANG, S. L.; TAN, H. C.; CHAN, Y. K.; CHOW, A.; LIM, A. P.; VASUDEVAN, S. G.; HANSON, B. J.; OOI, E. E. Ligation of Fc gamma receptor IIB inhibits antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 30, p. 12479-84, 2011.

CHAUDHRY, A.; RUDRA, D.; TREUTING, P.; SAMSTEIN, R. M.; LIANG, Y.; KAS, A.; RUDENSKY, A. Y. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. **Science**, v. 326, n. 5955, p. 986-91, 2009.

COFFEY, L. L.; MERTENS, E.; BREHIN, A. C.; FERNANDEZ-GARCIA, M. D.; AMARA, A.; DESPRES, P.; SAKUNTABHAI, A. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes Infect**, v. 11, n. 2, p. 143-56, 2009.

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, 2008.

DEJNIRATTISAI, W.; DUANGCHINDA, T.; LIN, C. L. S.; VASANAWATHANA, S.; JONES, M.; JACOBS, M.; MALASIT, P.; XU, X. N.; SCREATON, G.; MONGKOLSAPAYA, J. A Complex Interplay among Virus, Dendritic Cells, T Cells, and Cytokines in Dengue Virus Infections. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 5865-5874, 2008.

DEJNIRATTISAI, W.; JUMNAINSONG, A.; ONSIRISAKUL, N.; FITTON, P.; VASANAWATHANA, S.; LIMPITIKUL, W.; PUTTIKHUNT, C.; EDWARDS, C.; DUANGCHINDA, T.; SUPASA, S.; CHAWANSUNTATI, K.; MALASIT, P.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 745-8, 2010.

DITTMER, U.; HE, H.; MESSER, R. J.; SCHIMMER, S.; OLBRICH, A. R.; OHLEN, C.; GREENBERG, P. D.; STROMNES, I. M.; IWASHIRO, M.; SAKAGUCHI, S.; EVANS, L. H.; PETERSON, K. E.; YANG, G.; HASENKRUG, K. J. 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.; SO, T.; MEHTA, A. K.; CHOI, H.; CROFT, M. Inducible CD4+LAP+Foxp3- regulatory T cells suppress allergic inflammation. **J Immunol**, v. 187, n. 12, p. 6499-507, 2011.

DUANGCHINDA, T.; DEJNIRATTISAI, W.; VASANAWATHANA, S.; LIMPITIKUL, W.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; MALASIT, P.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. **PNAS**, v. 107, n. 39, p. 16922-16927, 2010.

ELREFAEI, M.; VENTURA, F. L.; BAKER, C. A.; CLARK, R.; BANGSBERG, D. R.; CAO, H. HIV-specific IL-10-positive CD8+ T cells suppress cytolysis and IL-2 production by CD8+ T cells. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 3265-71, 2007.

FISCHL, W.; BARTENSCHLAGER, R. Exploitation of cellular pathways by Dengue virus. **Curr Opin Microbiol**, v. 14, n. 4, p. 470-5, 2011.

- FRANCISCO, L. M.; SAGE, P. T.; SHARPE, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. **Immunol Rev**, v. 236, p. 219-42, 2010.
- FRITZ, R.; STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion. **J Cell Biol**, v. 183, n. 2, p. 353-61, 2008.
- GONCALVEZ, A. P.; ENGLE, R. E.; ST CLAIR, M.; PURCELL, R. H.; LAI, C. J. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 22, p. 9422-7, 2007.
- GREEN, S.; PICHYANGKUL, S.; VAUGHN, D. W.; KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A.; KURANE, I.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, v. 180, n. 5, p. 1429-35, 1999a.
- GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; NISALAK, A.; LEW, R.; INNIS, B. L.; KURANE, I.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. **J Infect Dis**, v. 179, n. 4, p. 755-62, 1999b.
- GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; NISALAK, A.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. **J Med Virol**, v. 59, n. 3, p. 329-34, 1999c.
- GUY, B.; BRIAND, O.; LANG, J.; SAVILLE, M.; JACKSON, N. Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p. 7100-11, 2015.
- GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Arch Virol**, v. 158, n. 7, p. 1445-59, 2013.
- GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTINEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, 2010.
- HALSTEAD, S. B.; COHEN, S. N. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 79, n. 3, p. 281-91, 2015.
- HATCH, S.; ENDY, T. P.; THOMAS, S.; MATHEW, A.; POTTS, J.; PAZOLES, P.; LIBRATY, D. H.; GIBBONS, R.; ROTHMAN, A. L. Intracellular cytokine production by dengue virus-specific T cells correlates with subclinical secondary infection. **J Infect Dis**, v. 203, n. 9, p. 1282-91, 2011.
- HOTTZ, E. D.; MEDEIROS-DE-MORAES, I. M.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; DE ASSIS, E. F.; VALS-DE-SOUZA, R.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; WEYRICH, A. S.; ZIMMERMAN, G. A.; BOZZA, F. A.; BOZZA, P. T. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. **J Immunol**, v. 193, n. 4, p. 1864-72, 2014.
- HUE, K. D.; TUAN, T. V.; THI, H. T.; BICH, C. T.; ANH, H. H.; WILLS, B. A.; SIMMONS, C. P. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. **J Virol Methods**, v. 177, n. 2, p. 168-73, 2011.

- IMRIE, A.; MEEKS, J.; GURARY, A.; SUKHBATAAR, M.; KITSUTANI, P.; EFFLER, P.; ZHAO, Z. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. **J Virol**, v. 81, n. 18, p. 10081-91, 2007.
- JAIN, B.; CHATURVEDI, U. C.; JAIN, A. Role of intracellular events in the pathogenesis of dengue; an overview. **Microb Pathog**, v. 69-70, p. 45-52, 2014.
- JOSEFOWICZ, S. Z.; LU, L. F.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 531-64, 2012.
- KARNAM, G.; RYGIEL, T. P.; RAABEN, M.; GRINWIS, G. C.; COENJAERTS, F. E.; RESSING, M. E.; ROTTIER, P. J.; DE HAAN, C. A.; MEYAARD, L. CD200 receptor controls sex-specific TLR7 responses to viral infection. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 5, p. e1002710, 2012.
- KING, C. A.; MARSHALL, J. S.; ALSHURFAFA, H.; ANDERSON, R. Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. **J Virol**, v. 74, n. 15, p. 7146-50, 2000.
- KINTER, A. L.; HENNESSEY, M.; BELL, A.; KERN, S.; LIN, Y.; DAUCHER, M.; PLANTA, M.; MCGLAUGHLIN, M.; JACKSON, R.; ZIEGLER, S. F.; FAUCI, A. S. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. **J Exp Med**, v. 200, n. 3, p. 331-43, 2004.
- KOBASA, D.; JONES, S. M.; SHINYA, K.; KASH, J. C.; COPPS, J.; EBIHARA, H.; HATTA, Y.; KIM, J. H.; HALFMANN, P.; HATTA, M.; FELDMANN, F.; ALIMONTI, J. B.; FERNANDO, L.; LI, Y.; KATZE, M. G.; FELDMANN, H.; KAWAOKA, Y. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. **Nature**, v. 445, n. 7125, p. 319-23, 2007.
- KURANE, I.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A.; MEAGER, A.; JANUS, J.; ENNIS, F. A. Activation of T Lymphocytes in Dengue Virus Infections - High Levels of Soluble Interleukin 2 Receptor, Soluble CD4, Soluble CD8, Interleukin 2, and Interferon- $\gamma$  in Sera of Children with Dengue. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1473-1480, 1991.
- LANTERI, M. C.; O'BRIEN, K. M.; PURTHA, W. E.; CAMERON, M. J.; LUND, J. M.; OWEN, R. E.; HEITMAN, J. W.; CUSTER, B.; HIRSCHKORN, D. F.; TOBLER, L. H.; KIELY, N.; PRINCE, H. E.; NDHLOVU, L. C.; NIXON, D. F.; KAMEL, H. T.; KELVIN, D. J.; BUSCH, M. P.; RUDENSKY, A. Y.; DIAMOND, M. S.; NORRIS, P. J. Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. **J Clin Invest**, v. 119, n. 11, p. 3266-77, 2009.
- LUHN, K.; SIMMONS, C. P.; MORAN, E.; DUNG, N. T.; CHAU, T. N.; QUYEN, N. T.; THAO LE, T. T.; VAN NGOC, T.; DUNG, N. M.; WILLS, B.; FARRAR, J.; MCMICHAEL, A. J.; DONG, T.; ROWLAND-JONES, S. Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. **J Exp Med**, v. 204, n. 5, p. 979-85, 2007.
- MACDONALD, A. J.; DUFFY, M.; BRADY, M. T.; MCKIERNAN, S.; HALL, W.; HEGARTY, J.; CURRY, M.; MILLS, K. H. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. **J Infect Dis**, v. 185, n. 6, p. 720-7, 2002.

- MAIER, H.; ISOGAWA, M.; FREEMAN, G. J.; CHISARI, F. V. PD-1:PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the liver. **J Immunol**, v. 178, n. 5, p. 2714-20, 2007.
- MANGADA, M. M.; ENDY, T. P.; NISALAK, A.; CHUNSUTTIWAT, S.; VAUGHN, D. W.; LIBRATY, D. H.; GREEN, S.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. **J Infect Dis**, v. 185, n. 12, p. 1697-703, 2002.
- MANGADA, M. M.; ROTHMAN, A. L. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4<sup>+</sup> T cells to heterologous serotypes. **J Immunol**, v. 175, n. 4, p. 2676-83, 2005.
- MANGIA, A.; SANTORO, R.; PIATTELLI, M.; PAZIENZA, V.; GRIFA, G.; IACOBELLIS, A.; ANDRIULLI, A. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. **Cytokine**, v. 25, n. 3, p. 103-9, 2004.
- MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunol Rev**, v. 225, p. 300-13, 2008.
- MATHEW, A.; TOWNSLEY, E.; ENNIS, F. A. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. **Future Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 411-25, 2014.
- MONTES DE OCA, M.; KUMAR, R.; DE LABASTIDA RIVERA, F.; AMANTE, F. H.; SHEEL, M.; FALEIRO, R. J.; BUNN, P. T.; BEST, S. E.; BEATTIE, L.; NG, S. S.; EDWARDS, C. L.; MULLER, W.; CRETNEY, E.; NUTT, S. L.; SMYTH, M. J.; HAQUE, A.; HILL, G. R.; SUNDAR, S.; KALLIES, A.; ENGWERDA, C. R. Blimp-1-Dependent IL-10 Production by Tr1 Cells Regulates TNF-Mediated Tissue Pathology. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 1, p. e1005398, 2016.
- MOORE, K. W.; MALEFYT, R. D. W.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. INTERLEUKIN-10 AND THE INTERLEUKIN-10 RECEPTOR. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J. A.; LU, G.; PYKE, A. T.; HEDGES, L. M.; ROCHA, B. C.; HALL-MENDELIN, S.; DAY, A.; RIEGLER, M.; HUGO, L. E.; JOHNSON, K. N.; KAY, B. H.; MCGRAW, E. A.; VAN DEN HURK, A. F.; RYAN, P. A.; O'NEILL, S. L. A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268-78, 2009.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.
- MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 587-619, 2011.
- MURRAY, N. E.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clin Epidemiol**, v. 5, p. 299-309, 2013.
- NAICKER, D. D.; WERNER, L.; KORMUTH, E.; PASSMORE, J. A.; MLISANA, K.; KARIM, S. A.; NDUNGU, T.; TEAM, C. A. I. S. Interleukin-10 promoter polymorphisms influence HIV-1 susceptibility and primary HIV-1 pathogenesis. **J Infect Dis**, v. 200, n. 3, p. 448-52, 2009.
- NASCIMENTO, E. J.; SILVA, A. M.; CORDEIRO, M. T.; BRITO, C. A.; GIL, L. H.; BRAGANETO, U.; MARQUES, E. T. Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6782, 2009.

- NG, J. K.; ZHANG, S. L.; TAN, H. C.; YAN, B.; MARTINEZ, J. M.; TAN, W. Y.; LAM, J. H.; TAN, G. K.; OOI, E. E.; ALONSO, S. First experimental in vivo model of enhanced dengue disease severity through maternally acquired heterotypic dengue antibodies. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 4, p. e1004031, 2014.
- PANDEY, N.; JAIN, A.; GARG, R. K.; KUMAR, R.; AGRAWAL, O. P.; LAKSHMANA RAO, P. V. Serum levels of IL-8, IFN $\gamma$ , IL-10, and TGF $\beta$  and their gene expression levels in severe and non-severe cases of dengue virus infection. **Arch Virol**, v. 160, n. 6, p. 1463-75, 2015.
- PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 1, p. 43-5, 2007.
- RIVINO, L.; KUMARAN, E. A.; THEIN, T. L.; TOO, C. T.; GAN, V. C.; HANSON, B. J.; WILDER-SMITH, A.; BERTOLETTI, A.; GASCOIGNE, N. R.; LYE, D. C.; LEO, Y. S.; AKBAR, A. N.; KEMENY, D. M.; MACARY, P. A. Virus-specific T lymphocytes home to the skin during natural dengue infection. **Sci Transl Med**, v. 7, n. 278, p. 278ra35, 2015.
- ROFFE, E.; ROTHFUCHS, A. G.; SANTIAGO, H. C.; MARINO, A. P.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; ECKHAUS, M.; ANTONELLI, L. R.; MURPHY, P. M. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 188, n. 2, p. 649-60, 2012.
- ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 532-43, 2011.
- ROUSE, B. T.; SEHRAWAT, S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 7, p. 514-26, 2010.
- SARANGI, P. P.; SEHRAWAT, S.; SUVAS, S.; ROUSE, B. T. IL-10 and natural regulatory T cells: two independent anti-inflammatory mechanisms in herpes simplex virus-induced ocular immunopathology. **J Immunol**, v. 180, n. 9, p. 6297-306, 2008.
- SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 245-246, 1986.
- SEHRAWAT, S.; ROUSE, B. T. Anti-inflammatory effects of FTY720 against viral-induced immunopathology: role of drug-induced conversion of T cells to become Foxp3<sup>+</sup> regulators. **J Immunol**, v. 180, n. 11, p. 7636-47, 2008.
- SEHRAWAT, S.; SUVAS, S.; SARANGI, P. P.; SURYAWANSHI, A.; ROUSE, B. T. 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. **J Virol**, v. 82, n. 14, p. 6838-51, 2008.
- SHAFIANI, S.; DINH, C.; ERTELT, J. M.; MOGUCHE, A. O.; SIDDIQUI, I.; SMIGIEL, K. S.; SHARMA, P.; CAMPBELL, D. J.; WAY, S. S.; URDAHL, K. B. 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. 1261-70, 2013.
- SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; TAKAHASHI, T.; ISHIDA, Y.; SAKAGUCHI, S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nat Immunol**, v. 3, n. 2, p. 135-42, 2002.
- SIMMONS, C. P. Dengue. **N Engl J Med**, v. 366, p. 1423-1432, 2012.



SNELL, L. M.; MCPHERSON, A. J.; LIN, G. H.; SAKAGUCHI, S.; PANDOLFI, P. P.; RICCARDI, C.; WATTS, T. H. CD8 T cell-intrinsic GITR is required for T cell clonal expansion and mouse survival following severe influenza infection. **J Immunol**, v. 185, n. 12, p. 7223-34, 2010.

ST JOHN, A. L. Influence of mast cells on dengue protective immunity and immune pathology. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 12, p. e1003783, 2013.

ST. JOHN, A. L.; RATHORE, A. P. S.; YAP, H.; NG, M.-L.; METCALFE, D. D.; VASUDEVAN, S. G.; ABRAHAM, S. N. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 22, p. 9190-9195, 2011.

SUAYA, J. A.; SHEPARD, D. S.; SIQUEIRA, J. B.; MARTELLI, C. T.; LUM, L. C. S.; TAN, L. H.; KONGSIN, S.; JIAMTON, S.; GARRIDO, F.; MONTOYA, R.; ARMIEN, B.; HUY, R.; CASTILLO, L.; CARAM, M.; SAH, B. K.; SUGHAYYAR, R.; TYO, K. R.; HALSTEAD, S. B. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 5, p. 846-855, 2009.

SUN, J.; MADAN, R.; KARP, C. L.; BRACIALE, T. J. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. **Nat Med**, v. 15, n. 3, p. 277-84, 2009.

SUVAS, S.; AZKUR, A. K.; KIM, B. S.; KUMARAGURU, U.; ROUSE, B. T. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 4123-32, 2004.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C. N.; BARRETO, F.; BARRETO, M. L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, p. S7-S18, 2009.

TEIXEIRA, M. G.; SIQUEIRA, J. B., JR.; FERREIRA, G. L.; BRICKS, L.; JOINT, G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 12, p. e2520, 2013.

TEMPORAO, J. G.; PENNA, G. O.; CARMO, E. H.; COELHO, G. E.; DO SOCORRO SILVA AZEVEDO, R.; TEIXEIRA NUNES, M. R.; DA COSTA VASCONCELOS, P. F. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 5, p. 938-40, 2011.

UBOL, S.; PHUKLIA, W.; KALAYANAROOJ, S.; MODHIRAN, N. Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. **J Infect Dis**, v. 201, n. 6, p. 923-35, 2010.

VAN DE WEG, C. A.; PANNUTI, C. S.; DE ARAUJO, E. S.; VAN DEN HAM, H. J.; ANDEWEG, A. C.; BOAS, L. S.; FELIX, A. C.; CARVALHO, K. I.; DE MATOS, A. M.; LEVI, J. E.; ROMANO, C. M.; CENTRONE, C. C.; DE LIMA RODRIGUES, C. L.; LUNA, E.; VAN GORP, E. C.; OSTERHAUS, A. D.; MARTINA, B. E.; KALLAS, E. G. Microbial translocation is associated with extensive immune activation in dengue virus infected patients with severe disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 5, p. e2236, 2013.

VIEIRA MACHADO, A. A.; ESTEVAN, A. O.; SALES, A.; BRABES, K. C.; CRODA, J.; NEGRAO, F. J. Direct costs of dengue hospitalization in Brazil: public and private health care systems and use of WHO guidelines. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3104, 2014.

WALKER, T.; JOHNSON, P. H.; MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRENTIU, F. D.; MCMENIMAN, C. J.; LEONG, Y. S.; DONG, Y.; AXFORD, J.; KRIESNER, P.; LLOYD, A. L.; RITCHIE, S. A.; O'NEILL, S. L.; HOFFMANN, A. A. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 450-3, 2011.

WEISKOPF, D.; SETTE, A. T-cell immunity to infection with dengue virus in humans. **Front Immunol**, v. 5, p. 93, 2014.

WEISLER, K. A.; GARCIA, V.; KROPF, E.; AITKEN, M.; BEDOYA, F.; WOLF, A. I.; ERIKSON, J.; CATON, A. J. Distinct modes of antigen presentation promote the formation, differentiation, and activity of foxp3+ regulatory T cells in vivo. **J Immunol**, v. 194, n. 8, p. 3784-97, 2015.

WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control -- New edition. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2009.

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).

WISE DE VALDEZ, M. R.; NIMMO, D.; BETZ, J.; GONG, H. F.; JAMES, A. A.; ALPHEY, L.; BLACK, W. C. T. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 12, p. 4772-5, 2011.

YAO, Z. Q.; KING, E.; PRAYTHER, D.; YIN, D.; MOORMAN, J. T cell dysfunction by hepatitis C virus core protein involves PD-1/PDL-1 signaling. **Viral Immunol**, v. 20, n. 2, p. 276-87, 2007.

ZELLWEGER, R. M.; EDDY, W. E.; TANG, W. W.; MILLER, R.; SHRESTA, S. CD8+ T cells prevent antigen-induced antibody-dependent enhancement of dengue disease in mice. **J Immunol**, v. 193, n. 8, p. 4117-24, 2014.

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. 128-39, 2010.

ZOMPI, S.; HARRIS, E. Original antigenic sin in dengue revisited. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 22, p. 8761-2, 2013.

## ANEXO A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

**Título do Projeto:** Estudo da dinâmica de células T com perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório da infecção pelo vírus da dengue como biomarcadores da evolução clínica

**Pesquisador Responsável:** Ricardo Tostes Gazzinelli

#### Pesquisadores participantes:

- Dr. Helton da Costa Santiago, UFMG e Centro de Pesquisas René Rachou
- Dra. Tércia Magalhães, Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte
- Dra. Lílian Diniz, Hospital das Clínicas da UFMG e Hospital João Paulo II
- Dr. Último Libânio, Hospital Santo Ivo
- Dr. Ken Gollob, Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte
- Dra. Lis Antonelli, Centro de Pesquisas René Rachou
- Marcela Helena Gonçalves Pereira, UFMG
- Gabrielle Ariadne Bento, UFMG

Telefones para contato e endereço para contato:

#### Endereço e telefone do responsável pelo estudo

- Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002)
- Secretária: Heloísa Helena Costa da Cruz – Tel: (31) 3349-7766
- Av. Antônio Carlos, 6627. ICB, sala Q4172 - Belo Horizonte (Cep: )
- Responsável: Helton da Costa Santiago - Tel: (31)3409-2664; (31) 3409-2634

#### Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética - CPqRR:

- Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002)
- Secretária: Bernadete Patrícia Santos– TeleFax: (31) 3349-7825

O objetivo desse estudo é buscar um melhor entendimento sobre a forma como o corpo humano responde à infecção pelo vírus da dengue. A dengue é um grave problema de saúde pública sendo a causa de internação milhares de pessoas no Brasil e no mundo, podendo levar à morte. Sabe-se pouco sobre a forma como o sistema de defesa do corpo humano (sistema imunológico) responde à infecção. O objetivo desse estudo é verificar com detalhes a resposta imunológica à dengue em pacientes com dengue clássica ou dengue grave (hemorrágica) e assim poder desenvolver melhores protocolos de tratamento e diagnóstico. Acreditamos que a resposta imunológica é fundamental para que as pessoas infectadas evoluem sem maiores lesões ou desenvolvam a dengue hemorrágica. Pretendemos recrutar cerca de 600 pessoas voluntárias dentre adultos e crianças infectadas com dengue, sendo cerca de 30-60 pessoas não infectadas, para estudar a resposta imunológica durante as diversas fases dessa infecção.

Para isso, pretendemos colher 60 mLs de sangue (cerca de 2 colheres de sopa) para adultos ou volume ajustados para a idade caso criança em cada visita, num total de 3 visitas em 1 mês, sendo a primeira no dia de hoje, a segunda cerca de 7 dias após o início dos sintomas e a terceira 30 dias após o início dos sintomas. Esse sangue será utilizado na realização de exames e testes de laboratório para verificar como cada indivíduo está combatendo a infecção. Caso você esteja internado, colheremos até 20 mLs de sangue a cada 2 dias para tais análises durante a internação. A coleta do sangue será realizada usando tubos pequenos através de uma punção na veia do membro superior da sua preferência em pelo menos três momentos da infecção (no momento do diagnóstico, após a remissão da febre e 30 dias após o início dos sintomas). É importante lembrar que a coleta de sangue pode causar desconforto e hematoma no local de introdução da agulha. Em raros casos, algumas pessoas desmaiam por verem o seu próprio sangue. Caso você concorde em participar, você deverá vir a esse hospital para atendimento gratuito em outras duas visitas a serem agendadas pela equipe do projeto. Seu transporte será custeado com recursos desse projeto. Além disso, você passará por um exame clínico detalhado. Você, ou seu filho, não será beneficiado diretamente por esse projeto, mas estará contribuindo para que médicos e cientistas entendam melhor essa doença com vistas de melhorar o tratamento e/ou diagnóstico no futuro. Garantimos o sigilo das suas informações pessoais e seu direito de sair do estudo a qualquer momento que desejar.

◆ Nome e Assinatura do pesquisador:

◆ CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, \_\_\_\_\_, idade\_\_\_\_, e CPF\_\_\_\_\_ abaixo assinado, concordo em participar do estudo sobre a dinâmica de células T com perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório da infecção pelo vírus da dengue como biomarcadores da evolução clínica, como voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data \_\_\_\_\_

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

Assinatura do sujeito: \_\_\_\_\_

**Em caso de sujeito menor que 18 anos:**

Nome do responsável: \_\_\_\_\_ (PAI / MÃE)

Assinatura do responsável: \_\_\_\_\_