

Ana Carolina Egypto Rosa Berbel

Modulação da Ativação de Linfócitos B pelo Vírus da Dengue



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Luciana Barros de Arruda



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
JULHO DE 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Berbel, Ana Carolina Egypto Rosa
Modulação da ativação de linfócitos B pelo vírus da dengue - Ana Carolina Egypto
Rosa Berbel – Rio de Janeiro, 2009
X, 62
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de
Góes, 2006.

Orientador: Luciana Barros de Arruda

Referências Bibliográficas: f112

1. Linfócito B; 2. Dengue; 3. Imunoglobulinas; 4. Citocinas; 5. Sinalização; 6.
MAPK I. Arruda, Luciana Barros. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo
de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. Modulação da ativação de linfócitos
pelo vírus da dengue.

Ana Carolina Egypto Rosa Berbel

Modulação da Ativação de Linfócitos B pelo Vírus da Dengue

Rio de Janeiro, 14 de julho de 2009

Luciana Barros de Arruda, Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goés, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Marcelo Torres Bozza, Doutor em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goés, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Claire Fernandes Kubelka, Doutora em Ciências (Microbiologia), Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz

Andrea Thompson Da Poian, Doutora em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ligia Maria Torres Peçanha, Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goés, Universidade Federal do Rio de Janeiro

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Imunologia das Infecções Virais, Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof^a Luciana Barros de Arruda.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a meus familiares, especialmente meus avós e minha mãe, que sempre me apoiaram e acreditaram que eu era capaz de alcançar meus objetivos com sucesso
- Ao meu namorado Felipe, pelo carinho e companheirismo nos momentos que mais precisei
- A minha orientadora pelos ensinamentos a mim concedidos, e a enorme paciência a mim conferida.
- A Prof^a Ligia Peçanha por todo o apoio e estrutura dados durante todo o meu tempo de laboratório
- Aos amigos do LAGIIVIR, especialmente Michelle, Naiara, Rodrigo e Carol Lucas por toda a ajuda e descontração nos momentos de estresse total.
- Aos queridos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia, Juliana, Thaline, Debora e Sidney por toda confiança e amizade com a qual sempre pude contar
- A minha querida amiga Queca pela confiança e grande amizade
- A banca avaliadora pela disponibilidade concedida a mim
- A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser realizado
- Aqueles que gentilmente deram o seu sangue para me ajudar a realizar essa dissertação
- A CAPES e a Fundação Charles Darwin pelo apoio financeiro e pelo tão sonhado imã
- A Deus, que me deu forças para continuar firme e forte!

Dedico este projeto a meus queridos avós Ivê e Eliete,

Ana Carolina Egypto Rosa Berbel

Modulação da Ativação de Linfócitos B pelo Vírus da Dengue

Orientador: Luciana Barros de Arruda

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

A infecção pelo vírus da dengue (DV) representa um grave problema de saúde pública, principalmente em países da Ásia e América Latina. Linfócitos B são potenciais alvos da infecção por DV e podem contribuir para a patogênese da doença através da produção de anticorpos, associados a potencialização da infecção e autoreatividade, ou através da secreção de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, a permissividade dessas células a infecção ainda não está clara e pouco se sabe sobre os mecanismos de ativação das mesmas induzidos pelo DV. Nós analisamos a susceptibilidade/permissividade de linfócitos B humanos ao DV através de citometria de fluxo e RT-PCR. Nossos resultados sugerem que tais células são fracamente infectadas pelo DV em comparação com monócitos. Além disso, a liberação de vírus nos sobrenadantes só foi observada após a inoculação de uma alta carga viral e esses sobrenadantes parecem não ser infecciosos, uma vez que o RNA viral não foi detectado em linhagens de células permissivas inoculadas com os mesmos. Analisamos também a secreção de imunoglobulinas na presença de diferentes sorotipos de DV. Observamos o vírus induz aumento da secreção de IgM por PBMC e linfócitos B purificados na sua forma nativa ou inativada, sugerindo que o DV induz ativação das células B de maneira independente de infecção produtiva. Nós observamos, ainda, que a infecção de linfócitos B com DV induz a fosforilação das MAP cinases (MAPK) Erk, e p38. A inibição dessas vias de sinalização levou a uma diminuição da secreção de IgM, sugerindo que a ativação dessas MAPK tem um papel importante na ativação de linfócitos B pelo DV. Avaliamos, então, o papel da molécula de CD81 na interação do vírus com o linfócito B, uma vez que já foi observada sua importância na infecção e ativação dessas células por outro vírus da mesma família. Constatamos que o bloqueio

de tal molécula leva a diminuição da secreção de IgM em cultura. Por fim, analisamos se o DV era capaz de induzir também a produção de IgG pelas células B. Observamos que o vírus induz o aumento na secreção desse isotipo de Ig por PBMC, mas não por linfócitos B purificados, sugerindo que a mudança de classe dependa de algum tipo celular ou fator solúvel presente em PBMC. Dados preliminares sugerem que a adição de IL-6 a cultura de células B purificadas infectadas induz secreção de IgG, sugerindo que essa pode ser uma das citocinas envolvidas nesse processo de ativação.

Nossos dados indicam que, apesar da baixa permissividade de linfócitos B ao DV, o vírus induz ativação dessas células por via dependente de fosforilação de MAPK e engajamento de CD81, entretanto a mudança de classe de Ig depende de mediadores produzidos por outros tipos celulares, como a IL-6

Palavras-chave: Linfócito B, Dengue, Imunoglobulinas, Citocinas, Sinalização, MAPK.

Rio de Janeiro
Julho de 2009

Ana Carolina Egypto Rosa Berbel

Modulação da Ativação de Linfócitos B pelo Vírus da Dengue

Orientador: Luciana Barros de Arruda

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Infection by dengue virus (DV) represents a serious public health problem, especially in Asia and Latin America countries. B lymphocytes are potential targets of DV infection and may contribute to the pathogenesis of this disease by producing antibodies associated with the infection enhancement and autoreactivity, or by secreting proinflammatory cytokines. However, it is not clear whether B cells are susceptible to DV and, and little is known about the mechanisms of B cell activation induced by the DV. We analyzed the susceptibility / permissiveness of human B lymphocytes to DV by flow cytometry and RT-PCR. Our results suggest that these cells are poorly infected by DV in comparison to monocytes. Furthermore, virus release in the supernatants was only observed after a high viral load inoculation. These supernatants do not appear to be infectious, since the viral RNA was not detected in permissive cell lines inoculated with them. We also analyzed the secretion of immunoglobulins in the presence of different serotypes of DV. We observed that the virus induces increased secretion of IgM by PBMC and purified B lymphocytes in their native or inactivated forms, suggesting that DV-induced B cells activation is independent on a productive infection. We also observed that infection of B cells with DV induces the phosphorylation of MAP kinases (MAPK) Erk, and p38. The inhibition of these signaling pathways resulted in a decrease in IgM secretion, suggesting that activation of these MAPK has an important role in the activation of B lymphocytes by DV. We then evaluated, the role of the CD81 molecule in the interaction of viruses with the B lymphocyte, since its importance for the infection and activation of these cells by other viruses of the same family was previously described. We observed that blocking this molecule leads to a decreased secretion of IgM by infected cells. Finally, we analyze if the DV was also able to induce

the production of IgG by B cells. We showed that the virus induces an increase in the secretion of this isotype of Ig by PBMC, but not by purified B lymphocytes. This data indicates that isotype class switch class depends on another cell type or soluble factor present in PBMC. Preliminary data suggest that the addition of IL-6 to infected B induces the secretion of IgG, suggesting that this may be one of the cytokines involved in this activation process.

Our data indicate that despite the low permissiveness of B lymphocytes to DV, the virus induces the activation of these cells in a way dependent on phosphorylation of MAPK and engagement of CD81, however the Ig class switch is dependent on mediators produced by other cell types such as the IL-6.

Key-words: B lymphocyte, Dengue, Immunoglobulins, Cytokines, Signalling, MAPK.

Rio de Janeiro
Julho de 2009

ÍNDICE

	Páginas
Resumo	vii
Abstract	ix
Glossário	xiv
I) Introdução	1
I. 1) Epidemiologia da dengue	1
I. 2) Classificação e estrutura do vírus da Dengue	2
I. 3) Interação vírus-célula	3
I. 4) Biossíntese Viral	4
I. 5) Patogênese viral e manifestações clínicas	4
I. 5. 1) Potencialização da infecção mediada por anticorpos (ADE)	5
I. 5. 2) Secreção de citocinas e respostas inflamatórias na dengue	6
I. 6) Linfócitos B e a Dengue	7
I. 7) Ativação de linfócitos B	10
I. 8) Sinalização via MAPK	12
I. 9) Papel biológico da molécula CD81	13
I. 10) Racional da dissertação	16
II) Objetivos	17
II. 1) Racional	17
II. 2) Objetivos específicos	17
III) Materiais e Métodos	18
III. 1) Vírus	18
III. 2) Titulação viral	18
III. 3) Obtenção de linfócitos B humanos	19
III. 4) Análise da infecção pelo vírus da dengue	20
III. 4.1) Análise da infecção por citometria de fluxo	20

III. 4. 2) Análise da infecção por RT-PCR	21
III. 4. 2. 1) Extração de RNA viral	21
III. 4. 2. 2) RT-PCR	21
III. 5) Dosagem de imunoglobulinas por ELISA	22
III. 6) Avaliação da viabilidade celular	23
III. 7) Avaliação da secreção de IL-6 por linfócitos B na presença de DV	23
III. 8) Análise da fosforilação de proteínas intracelulares por western blotting	24
III. 8. 1) Dosagem de proteínas	24
III. 8. 2) Western Blotting	24
III. 9) Análise do papel de outros tipos celulares ou mediadores solúveis na ativação de células B induzida pelo DV	25
III .9.1) Análise do papel de monócitos na ativação de linfócitos B induzida pelo DV	26
III .9.2) Análise do papel IL-6 na modulação da ativação de linfócitos B mediada pelo DV	26
III.10) Análise estatística	26
IV) Resultados	27
IV. 1) Análise da infecção de células B pelo DV	27
IV. 2) Análise da secreção de IgM por PBMC	30
IV. 3) O vírus da dengue induz secreção de IgM diretamente por células B purificadas	32
IV .4) O vírus da dengue induz o aumento da secreção de IL-6	33
IV. 5) Indução da fosforilação de MAPK por vírus da dengue	34
IV. 6) O bloqueio da ativação de Erk e p38 MAPK inibe a secreção de IgM mediada pelo DV	36
IV. 7) O bloqueio de CD81 inibe a secreção de IgM pelo DV	37
IV. 8) O vírus da dengue não induz secreção de IgG por linfócitos B purificados	39

IV. 9) Sobrenadante de monócitos infectados por DV induz mudança de classe de Ig	40
IV. 10) Adição de IL-6 exógena induz aumento da secreção de IgG pelo DV	41
V) Discussão	43
VI) Referências	50

GLOSSÁRIO

ADE	Potencialização da infecção mediada por anticorpos (“Antibody-dependent enhancement”)
BCR	Receptor de Célula B (“B cell receptor”)
BSA	Soroalbumina Bovina (“Bovin serum albumin”)
C	Proteína do core viral
CD	Grupo de diferenciação (“Cluster of differentiation”)
CPE	Efeito citopático (“Cytopathogenic effect”)
CRP	Proteína C reativa (“C reactive protein”)
DV	Vírus da dengue (“Dengue virus”)
E	Proteína do envelope do vírus da dengue
ELISA	Ensaio imunoenzimático (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)
ERK	Quinase regulada extracelularmente (“Extracellular-regulated kinase”)
Fc	Porção constante da imunoglobulina
FcR	Receptor para porção constante da imunoglobulina
FD	Febre clássica da dengue
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (“Fluorescein isothiocyanate”)
FHD	Febre hemorrágica da dengue
GDP	Guanosina di-fosfato (Guanosine di-phosphate)
GEF	Fatores de troca de nucleotídeos guaninas (“guanine-nucleotide exchange factors”)

GTP	Guanosina tri-fosfato (Guanosine-tri-phosphate)
HSP	Proteína do choque térmico (“Heat shock protein”)
IC	Imunocomplexo
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ITAM	Motivos ativadores baseados nos imunoreceptores de tirosina (“Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs”)
JNK	Jun N-terminal kinase
LEL	Grande loop extracelular (“large extracellular loop”)
M	Proteína da membrana viral
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos (“Mitogen-activated protein kinase”)
MOI	Multiplicidade de infecção (“Multiplicity of infection”)
NS	Proteína não-estrutural (“Non-structural protein”)
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (“Peripheral blood mononuclear cells”)
PE	Ficoeritrina (“Phycoeritrin”)
PBS	Tampão salino de fosfato (“Phosphate Buffered Saline”)
PLA2	Fosfolipase A2 (“phospholipase A2”)
PWM	Ativador policlonal (“Poke weed mitogen”)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase - Transcriptase reversa (“Reverse transcriptase- polymerase chain reaction”)
SAC	Proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> cepa Cowan (“ <i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I”)

SCD	Síndrome do choque da dengue
SEL	Pequeno loop extracelular ("small extracellular loop")
SFB	Soro fetal bovino
SH	Domínios homólogos de Src ("Src homology domain")
TBS	Tampão Tris salino ("Tris buffered saline")
TNF	Fator de necrose tumoral ("tumor necrosis factor")

D) INTRODUÇÃO

I. 1) Epidemiologia da dengue

A dengue é uma doença infecciosa causada por um *Flavivirus* que ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais do planeta. Ela é transmitida por mosquitos das espécies *Aedes* (*Stegomyia*), principalmente *Ae aegypti* e também por *Ae albopictus* e alguns vetores endêmicos como *Ae polynesiensis* na Polinésia Francesa (Rosen *et al.*, 1954). Nos dez dias seguintes à ingestão do sangue infectado pela fêmea do mosquito, há a replicação viral em diferentes tecidos deste mosquito levando finalmente à infecção de suas glândulas salivares (Salazar *et al.*, 2007). A infecção das glândulas salivares e conseqüente injeção da saliva contendo partículas infecciosas no hospedeiro humano são eventos chaves no ciclo de transmissão do vírus da dengue.

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae* e apresenta 4 sorotipos geneticamente distintos, sendo denominados DV1-DV4 (Degallier *et al.*, 2003; de Lima-Camara, Honório & Oliveira, 2006).

Estimativas sugerem que anualmente cerca de 100 milhões de casos de febre da dengue (FD) e meio milhão de casos de febre hemorrágica (FHD) ocorram no mundo, com casos de fatalidade principalmente em países asiáticos (Malavige, *et al.*, 2004). Além disso, cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas onde a dengue pode ser transmitida (WHO, 2008). No Brasil, o 1º sorotipo viral a circular foi o DV1, em 1982. Em 1990, o DV2 entrou no país e, mais recentemente, a partir de 2001, foram observados casos relacionados ao sorotipo 3 (PAHO, 2006). Segundo dados epidemiológicos, nas dez primeiras semanas do ano de 2009 foram notificados 114.355 casos da doença, representando uma queda de 28,6% em relação ao mesmo período de 2008. O Ministério da Saúde informa ainda que, até este período, foram registrados 235 casos de Febre Hemorrágica de Dengue (FHD), com 16 óbitos. De acordo com o boletim parcial, cinco estados concentram 72% dos casos de FHD: Bahia (30%), Espírito Santo (15,8%), Mato Grosso (11,5%), Roraima (9%) e Minas Gerais (6%). Quanto aos casos de Dengue com Complicação (DCC), houve 368 notificações com sete mortes no período avaliado. Em 2008, no mesmo período, ocorreram 1.445 casos de FHD e 5.258 de DCC (Ministério da Saúde, 2009).

I. 2) Classificação e estrutura do vírus da Dengue

A família *Flaviviridae* é composta por patógenos virais, responsáveis por causar um amplo espectro de doenças tanto em homens quanto em animais. Esta família apresenta 3 gêneros virais: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. Os *Flavivírus* possuem a capacidade de replicação tanto no homem, quanto em mosquitos, o que demonstra uma adaptação a diferentes tipos celulares.

Os vírus da dengue apresentam de 40 a 60nm de diâmetro, são esféricos, envelopados e apresentam uma única fita de RNA de polaridade positiva que apresenta aproximadamente 11Kb. O genoma possui apenas uma seqüência de leitura (ORF) e é constituído de 10 genes capazes de codificar 3 proteínas estruturais (E, M e C) e 7 não estruturais (NS1, NS2a e NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). A proteína C, capaz de se ligar ao RNA genômico, está localizada no nucleocapsídeo viral, o qual é responsável pela proteção do material genético do vírus. A glicoproteína E codifica importantes propriedades imunogênicas e fenotípicas do vírion. Ela é responsável por mediar a fusão intramembranar e iniciar a infecção através da sua ligação à superfície celular (Roehrig, *et al*, 2004). O papel direto da proteína M e pré-M durante o início da infecção não é conhecido. A glicoproteína pré-M é clivada pela furina, uma protease celular, o que promove a liberação de um resíduo “pr” N-terminal durante a maturação, deixando somente o ectodomínio e a porção C-terminal transmembranar da proteína M do vírion (Zhang *et al.*, 2003). Tal evento de maturação é necessário para que haja a exposição do domínio de ligação do envelope viral ao receptor presente na célula, permitindo a infecciosidade do vírus (Clyde, Kyle & Harris, 2006). Foi observado *in vitro*, que anticorpos monoclonais anti PrM causam um baixo nível de neutralização viral. Esta capacidade pode ter alguma co-relação com a reatividade cruzada entre a proteína E a própria proteína M. Além disso, sabe-se que a proteína M induz uma resposta imune protetora e já foi observado que o peptídeo “pr” protege vírions imaturos contra uma fusão prematura com a membrana da célula hospedeira (Keelapang, *et al*, 2004).

Dentre as proteínas não estruturais, a NS1 é a responsável pela fixação do complemento e parece estar envolvida na maturação do vírus. Mutações presentes na proteína NS1 podem afetar a virulência do vírus da dengue (Pletnev, Bray & Lai, 1993). Tal glicoproteína, diferentemente das outras proteínas não-estruturais, pode ser tanto secretada pela célula quanto estar associada à membrana. Ambas as formas da NS1 observadas são imunogênicas uma vez que possuem determinantes específicos permitindo o reconhecimento como importante antígeno na infecção (Falconar & Young, 1990; Young *et al.*, 2000). Células

infectadas que apresentam tal proteína na sua superfície se tornam alvos de atividade citotóxica mediada por linfócitos T CD8⁺ (Mathew *et al.* 1996).

A proteína NS3 apresenta uma função de protease viral ativa no processo pós-transducional. No entanto, comparações seqüenciais e análises bioquímicas sugerem que a NS3 é provavelmente uma proteína trifuncional, contendo atividades de serina protease, helicase e RNA trifosfatase. As proteínas NS2 e NS4 são pequenas proteínas hidrofóbicas, não estruturais, cujas funções ainda não estão bem caracterizadas. A proteína NS2b apresenta-se como um co-fator da NS3. Já NS2a, assim como NS4a e NS4b apresentam-se formando um complexo que atua na síntese do RNA viral e montagem viral. A proteína NS5 apresenta tanto uma função de polimerase RNA dependente, quanto de metiltransferase, sendo de grande importância para a replicação viral (Lindenbach & Rice, 2001).

I. 3) Interação vírus-célula

Assim como diversos vírus de RNA polaridade positiva, os flavivírus se replicam no citoplasma de células susceptíveis. Embora um receptor específico responsável pela internalização de tais vírus nas células-alvo ainda não tenha sido identificado, uma série de moléculas tem sido descritas como capazes de mediar a interação do vírus com diferentes tipos celulares. Uma destas é o CD14, encontrada tanto em células dendríticas, que agem como transportadoras do vírus a órgãos linfóides secundários iniciando a resposta imune, quanto em monócitos e macrófagos, que atuam no espalhamento viral para vários órgãos periféricos mediando reações inflamatórias *in situ* (Chen, Wang & King, 1999). Outros receptores virais são o heparan sulfato e a condroitina E. Essas são glicosaminoglicanas (GAG) presentes em superfícies celulares e em matriz extracelular, capazes de se ligar à proteína E iniciando o processo de infecção (Chen *et. al.*, 1997). Essas GAGs também parecem mediar a ligação da proteína NS1 solúvel à superfície de células endoteliais (Avirutnan *et. al.*, 2007). Proteínas do choque térmico HSP90 e HSP70 também parecem fazer parte de um complexo receptor requerido para a entrada viral na célula. Em células de mosquito (C6/36), a HSP70 é capaz de guiar o vírus durante o mecanismo de entrada na célula (Ren *et. al.*, 2007). Foi demonstrado que o bloqueio das mesmas em linhagens monocíticas e de neuroblastoma inibe significativamente a infecção por DV (Reyes-del Valle, *et al.*, 2005). Outras moléculas descritas como receptores virais foram o DC-SIGN, expresso principalmente em células dendríticas imaturas e o L-SIGN, expresso por certas células endoteliais. Foi observado que bloqueio de tais moléculas em células dendríticas e monócitos

inibe a entrada viral em ambas as células, sugerindo que a infecção dependa especificamente destas lectinas (Tassaneeritthep *et. al.* 2003). Recentemente, foi visto que receptores de manose se ligam a partículas virais crescidas em células de mosquito e a glicoproteínas de envelope recombinantes. Sugeriu-se que o receptor de manose é um receptor funcional do vírus da dengue em macrófagos humanos (Miller *et. al.*, 2008).

I. 4) Biossíntese Viral

O mecanismo de entrada do vírus na célula ainda não foi bem elucidado. Estudos preliminares demonstraram, através de microscopia eletrônica, evidências de uma fusão direta com a membrana plasmática (Hase , Summers & Eckels, 1989; Lim & Ng, 1999). No entanto, estudos recentes indicam que após a interação com receptores presentes na membrana das células alvo, o vírus é endocitado em um processo que envolve a participação de clatrininas presentes na superfície de vesículas promovendo o seu englobamento (Acosta, Castilla & Damonte, 2008; van der Schaar *et al.*, 2008). Durante este processo de endocitose, ocorre uma mudança conformacional da proteína E que é dependente do pH, levando a fusão do envelope viral com a membrana da vesícula e posterior liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira (Rice & Strauss, 1986; Modis *et al.*, 2004).

Com o RNA livre no citoplasma, começa a sua tradução primeiramente em uma poliproteína, que será clivada nas proteínas estruturais e não-estruturais. A replicação ocorre de forma semi-conservativa e assimétrica, começando pela síntese de uma fita de RNA complementar de polaridade negativa que servirá como molde para a posterior produção de novas fitas de RNA de polaridade positiva. A montagem final do vírus ocorre próximo ao retículo endoplasmático, onde este passa a apresentar seu envelope. Com isso, o transporte da partícula viral madura à membrana citoplasmática é feito através de vesículas que se fundem e promovem a exocitose desta partícula viral, a qual poderá infectar outras células (Rice & Strauss, 1986).

I. 5) Patogênese viral e manifestações clínicas

A infecção causada por qualquer dos sorotipos de vírus da dengue pode gerar desde sintomas relativamente brandos, que caracterizam a febre clássica da dengue (FD), até manifestações severas de febre hemorrágica (FHD) ou a síndrome do choque da dengue (SCD). Estas últimas estão associadas à plaquetopenia, coagulação vascular disseminada e

aumento da permeabilidade vascular, resultando em derrames ou até mesmo casos de choque hipovolêmico (Juffrie, *et al.*, 2001).

Estudos anteriores sugerem que a FHD e SCD podem estar associadas a diferenças no grau de virulência de diferentes amostras virais (Rico-Hesse, *et al.*, 1997). Já foi relatado, por exemplo, que alguns genótipos de DV2 provenientes da Ásia aparentam ser mais virulentos do que aqueles inicialmente descobertos nas Américas e no Pacífico Sul (Cologna & Rico-Hesse, 2003; Pryor, *et al.*, 2001).

Além da diferença no grau de virulência do vírus, fatores imunopatológicos também estão associados ao desenvolvimento de formas graves da infecção. Nesse sentido, uma hipótese sugerida é a teoria da potencialização da infecção mediada por anticorpos (ADE, do inglês *antibody-dependent enhancement*) (Halstead & O'Rourke, 1977). Essa hipótese foi desenvolvida a partir da observação de dados epidemiológicos que apontam para uma maior probabilidade de desenvolvimento de formas graves de dengue após infecções heterotípicas secundárias (Halstead, 1970).

1.5.1) Potencialização da infecção mediada por anticorpos (ADE)

A “ADE” foi uma das primeiras hipóteses propostas na tentativa de elucidar a patogênese das formas graves de dengue. De acordo com essa hipótese, em uma infecção primária por um sorotipo viral, são produzidos anticorpos neutralizantes específicos para aquele sorotipo. No entanto, em uma infecção secundária por outro sorotipo, anticorpos heterólogos pré-existentes são incapazes de neutralizar o sorotipo infectante, formando imunocomplexos com os mesmos. Esses vírus complexados a anticorpos são capazes de infectar com maior eficiência células mononucleares via receptor para porção Fc de imunoglobulina (FcR), levando a uma maior produção de vírus (Halstead & O'Rourke, 1977). De fato, experimentos *in vitro* revelaram que monócitos apresentavam maior taxa de infecção quando as partículas virais foram associadas a soro imune de pacientes infectados, em títulos sub-neutralizantes (Lin, *et al.*, 2002a). Um fenômeno semelhante foi observado em células dendríticas maduras, sugerindo que as mesmas também sejam susceptíveis ao ADE. Esse padrão de potencialização pôde ser detectado após uma regulação negativa do receptor DC-SIGN durante a maturação e esse evento requer a expressão de Fc γ RIIa, um receptor presente na superfície celular, responsável pela ativação da célula alvo (Boonnak *et al.*, 2008).

Apesar de dados indicando o papel de anticorpos na infecção de células monocíticas, uma diferença significativa entre a carga viral na ausência e presença do soro só foi observada

após 24h de infecção. Esses achados sugerem que mecanismos intracelulares ocorridos após a entrada viral apresentam maior importância no processo de potencialização da infecção.

1.5.2) Secreção de citocinas e resposta inflamatória na dengue

A dengue é uma doença multifatorial e está relacionada à ativação de diversos tipos celulares culminando na secreção, em níveis aumentados, de anafilatoxinas e também de citocinas pró e anti-inflamatórias pelas células infectadas. Já foi observado que a infecção de células monocíticas com vírus na forma de imunocomplexos é seguida por uma regulação positiva tanto de IL-6 quanto de IL-10, enquanto os níveis de IL-12 e IFN- γ aparecem diminuídos, o que demonstra uma tendência de resposta tipo Th2, em detrimento a resposta Th1 no caso de “ADE” (Chareonsirisuthigul, Kalayanaroo & Ubol, 2007). Corroborando com esses dados, já foi sugerido que em formas brandas da doença, como ocorre na FD, há uma resposta predominantemente do tipo Th1, comparado ao padrão Th2 comumente apresentado no desenvolvimento das formas graves, como na FHD. Nesses casos, níveis aumentados de IL-4, IL-6 e IL-10 foram observados em soro de pacientes principalmente em uma infecção aguda, enquanto os níveis de IFN- γ e IL-12 apresentavam-se baixos, contrastando com seus altos níveis observados nos casos de FD (Chaturvedi, *et al.*, 1999). Em outro estudo, foi também demonstrado que o IFN- γ apresenta atividade antiviral e, além disso, pode levar a um aumento da ativação de células dendríticas infectadas e da produção de IL-12. Estas atividades contribuem para a diminuição da produção de partículas virais e para a redução da severidade da doença. (Libraty *et al.*, 2001).

Alguns estudos correlacionam a produção de IL-6 com a severidade da dengue (Juffrie, *et al.*, 2001). Tal citocina, em altos níveis, é capaz de induzir o aumento da permeabilidade vascular, como nos casos de FHD e SCD, sendo também responsável pela amplificação no recrutamento de leucócitos em reações inflamatórias, o que promove injúrias nas células endoteliais (Huang, *et al.*, 2000). Essa citocina estimula a síntese de proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa (CRP), e a fosfolipase secretória A2 (sPLA2) tipo II pelo fígado (Juffrie, *et al.*, 2001). Além disso, a IL-6 já foi demonstrada ser importante na indução da diferenciação de linfócitos B (Takatsu, 1997).

A ativação de linfócitos e outras células efetoras podem levar, ainda, a um aumento nos níveis de TNF- α , IL-8 e outros mediadores associados com a patogênese. Estes

mediadores podem contribuir para o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento (Avirutnan, *et al.*, 1998; Green, *et al.*, 1999).

A presença do vírus na forma de imunocomplexos pode, ainda, induzir uma ativação do sistema complemento com subsequente liberação de anafilotoxinas, como C3a e C5a. Essas são moléculas vasoativas e estão associadas ao aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma, que são as principais manifestações apresentadas nas formas graves da doença (Halstead & O'Rourke, 1977; Rothman & Ennis, 1999). De fato, alguns grupos demonstraram que durante o estágio de choque da dengue, o sistema complemento é ativado tanto pela via clássica quanto pela via alternada (Memoranda, 1973).

A infecção pelo vírus da dengue também é capaz de levar a eventos de apoptose, cuja ocorrência já foi demonstrada *in vivo* especificamente em células T CD8⁺, hepatócitos e células de Kupffer de pacientes infectados (Huerre *et al.*, 2001; Myint *et al.*, 2006). Eventos de apoptose foram documentados, *in vitro*, envolvendo, dentre outras células, células endoteliais e monócitos infectados (Avirutnan *et al.*, 1998; Espina *et al.*, 2003). Recentemente, Brown e colaboradores demonstraram a primeira evidência da indução da apoptose dependente de caspase em uma infecção pelo vírus da dengue na presença do ADE, em linhagens de mastócitos humanos. Tal evidência indica a importância da presença de receptores Fc na interação com o vírus em detrimento da alta expressão dos receptores DC-SIGN e L-SIGN na indução da apoptose (Brown *et al.*, 2009).

I. 6) Linfócitos B e a Dengue

A infecção primária pelo vírus da dengue promove a estimulação da produção de IgM, detectável a partir do 4º dia de infecção sintomática. A produção desta imunoglobulina apresenta seu maior nível por volta do 8º dia e começa a declinar lentamente a partir deste período, até que torne-se indetectável após alguns meses. A produção de IgG também pode ser observada a partir do 4º dia, em níveis baixos, os quais se elevam em cerca de 2 semanas, permanecendo detectáveis por anos. Esse nível detectável de IgG confere uma imunidade contra o sorotipo causador da infecção (Figueiredo & Fonseca, 2004).

A infecção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) tem sido largamente estudada e, em monócitos aderentes, se detectam frequentemente partículas virais. Embora a maioria dos estudos se concentre na infecção de monócitos, observações clínicas em pacientes infectados demonstraram que o antígeno viral aparece também em linfócitos B (Boonpucknavig, *et al.*, 1976). No entanto, a infecção de linfócitos B pelo vírus da dengue

ainda não foi muito bem esclarecida. Lin e colaboradores observaram, através da detecção intracelular de NS1 e da proteína do core, que as células B são capazes de suportar a infecção, *in vitro*, quando utilizada uma alta multiplicidade de infecção (MOI=10) (Lin, *et al.*, 2002a). Esses mesmos autores sugeriam, ainda, que tanto monócitos quanto linfócitos B são alvos potenciais para a potencialização mediada por anticorpos (ADE), uma vez que tais células apresentam FcR em sua superfície (Lin, *et al.*, 2002a). Os dados que apontam o fenômeno de ADE em linfócitos B são intrigantes, uma vez que essas células expressam receptores do tipo Fc γ RIIB, que normalmente não estão associados à captura de antígeno. Entretanto, o “enhancement” também já foi demonstrado em linhagens celulares que não expressam FcR, sugerindo a participação de outros receptores nesse processo (Huang, *et al.*, 2006).

Apesar de estudos caracterizando a infecção de linfócitos B, estudos recentes avaliando a infecção de PBMCs e esplenócitos demonstraram que apenas monócitos de sangue periférico e macrófagos esplênicos eram modestamente permissivos a infecção viral, exibindo uma significativa potencialização da infecção na presença de um soro imune altamente diluído. Por outro lado, células T e B esplênicas ou de sangue periférico não se apresentavam permissivas ao vírus da dengue mesmo na presença de soro imune. Estes resultados, no entanto, não excluem um possível papel dessas células como células responsivas durante o desenvolvimento das formas mais graves da doença, atuando como reservatórios para a replicação viral (Blackley, *et al.*, 2007; Kou, *et al.*, 2008)

Linfócitos B infectados *in vitro*, além de serem possíveis alvos da replicação viral, secretam citocinas, tais como a IL-6 e o TNF- α , que são encontradas em altos níveis em casos de FHD e SCD (Lin, *et al.*, 2002a; Bethell, *et al.*, 1998; Hober, *et al.*, 1993). A infecção e/ou ativação de linfócitos B pode estar associada, ainda, a produção de autoanticorpos. Anticorpos anti-plaquetas e anti-células endoteliais já foram observados em pacientes (Falconar, 1997; Lin, *et al.*, 2001; Lin, *et al.*, 2002b), e poderiam estar relacionados à coagulopatia e vasculopatia, duas das principais manifestações clínicas das formas mais graves da doença.

Em conjunto, esses achados indicam um papel importante dos linfócitos B na patogênese da dengue, atuando através da secreção de imunoglobulinas (Ig), envolvidas no mecanismo de potencialização da infecção e em processos de autoreatividade, além de produzirem citocinas usualmente aumentadas nas formas graves de infecção. Entretanto, os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na ativação dos linfócitos B pelo DV ainda não foram caracterizados. Da mesma forma, não foi descrito até o momento nenhum receptor que possa estar envolvido no processo de infecção ou ativação dessas células pelo vírus.

Um possível receptor que pode estar atuando nessa infecção é o DC-SIGN (CD209), cuja participação no processo de internalização viral já foi descrito em células dendríticas (Tassaneetrihep, *et. al.*, 2003). Embora tal molécula também esteja presente em linfócitos B, sua participação direta durante uma infecção destas células ainda não foi analisada. Além do DC-SIGN, receptores do tipo Toll (TLRs) podem estar associados à infecção viral e/ou ativação de linfócitos B. Sabe-se que TLR3, TLR7 e TLR8 são importantes mediadores de reconhecimento e ativação do sistema imune para vírus de RNA, como é o caso dos flavivirus. Já foi descrito que TLRs participam na ativação celular e produção de citocinas induzida pelo vírus da hepatite C. Nesse modelo, a ativação via TLR2 induz o aumento na produção das citocinas TNF- α e IL-10 por macrófagos derivados de monócitos humanos (Chang, Dolganiuc & Szabo, 2007). Além disso, o engajamento de TLR3 induziu o aumento da produção de IFN- β por linhagens de hepatócitos humanos (Naka *et. al.*, 2006).

Ativação de TLR pelo vírus da dengue também foi relatada em diferentes tipos celulares. Num modelo de linhagem monocítica humana foi observado que a infecção induz aumento da expressão de TLR3. A ativação desse receptor promove a secreção de IL-8 e de IFN- α/β , o que parece contribuir para uma inibição da replicação viral (Tsai *et al.*, 2009).

O DV é capaz de ativar células dendríticas plasmacitóides humanas de maneira dependente de TLR7, uma vez que na presença de um antagonista de TLR7, foi observada uma diminuição altamente significativa da liberação de IFN α pelas células infectadas (Wang *et. al.*, 2006). Foi recentemente observado, ainda, que durante a infecção grave pelo vírus da dengue as expressões gênicas de TLR7 e TLR4R3 (variante do TLR3) apareceram aumentadas (de Kruif, *et. al.*, 2008). Vale ressaltar que TLR7 e TLR3 são moléculas capazes de reconhecer padrões intracelulares que estão presentes no interior de vesículas endossomais. Sendo assim, estes estariam atuando em uma etapa posterior a internalização e não como receptores agindo na adsorção ou fusão com a célula alvo. É possível que receptores tipo toll presentes na superfície celular, como TLR2 ou TLR4 tenham função de receptores para o vírus da dengue e contribuam para ativação linfocitária. Entretanto, a expressão dessas moléculas em linfócitos B humanos está restrita a células ativadas (Peng, 2005), sugerindo que outras classes de receptores devam atuar em estágios iniciais de ativação celular pelo DV ou como receptores de células B virgens.

I. 7) Ativação de linfócitos B

Os linfócitos B apresentam como principal função efetora a secreção de anticorpos, induzida após interação com o antígeno. As moléculas de reconhecimento de antígeno são as imunoglobulinas (Igs), produzidas pelas células B com uma grande variedade de especificidades. Ligadas à membrana, as imunoglobulinas exercem uma função de receptores de antígenos, passando a ser chamadas de receptor de células B (BCR) (Reth, 1989). O BCR é uma estrutura multiproteica que contém uma imunoglobulina de membrana ligadora de antígeno (IgM) que não apresenta função direta na sinalização uma vez que moléculas de IgM não apresentam porção intracitoplasmática. A sinalização é mediada por um heterodímero não-covalentemente associado à IgM, os elementos $Ig\alpha$ (CD79a) e $Ig\beta$ (CD79b), que contêm em seu domínio intracitoplasmático, um padrão molecular ativador de tirosina-quinases (ITAM) (Gauld, Dal Porto & Cambier, 2002). Evidências indicam que o BCR é composto somente por uma imunoglobulina e um complexo $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ que pode residir na membrana linfocitária como um dímero ou um multímero (Schamel & Reth, 2000). A ligação do antígeno a receptores nas células B induz a propagação de sinais intracelulares, em direção ao núcleo, capazes de alterar o comportamento celular e promover mudanças na expressão de genes que coordenam a resposta dos linfócitos. Os sinais propagados através do BCR são considerados vitais para o desenvolvimento dos linfócitos B e resposta aos antígenos. Na figura 1 é apresentado um esquema demonstrando algumas dessas vias de sinalização. Nesse esquema, podemos observar que após a ligação do antígeno a IgM, ocorre uma agregação e subsequente fosforilação desses resíduos de tirosina (ITAM) pelas quinases da família Src (Lyn, Fyn ou Blk). Com isso, há a formação de um sítio de ligação para a um domínio SH2 da quinase Syk, culminando então na cascata de sinalização.

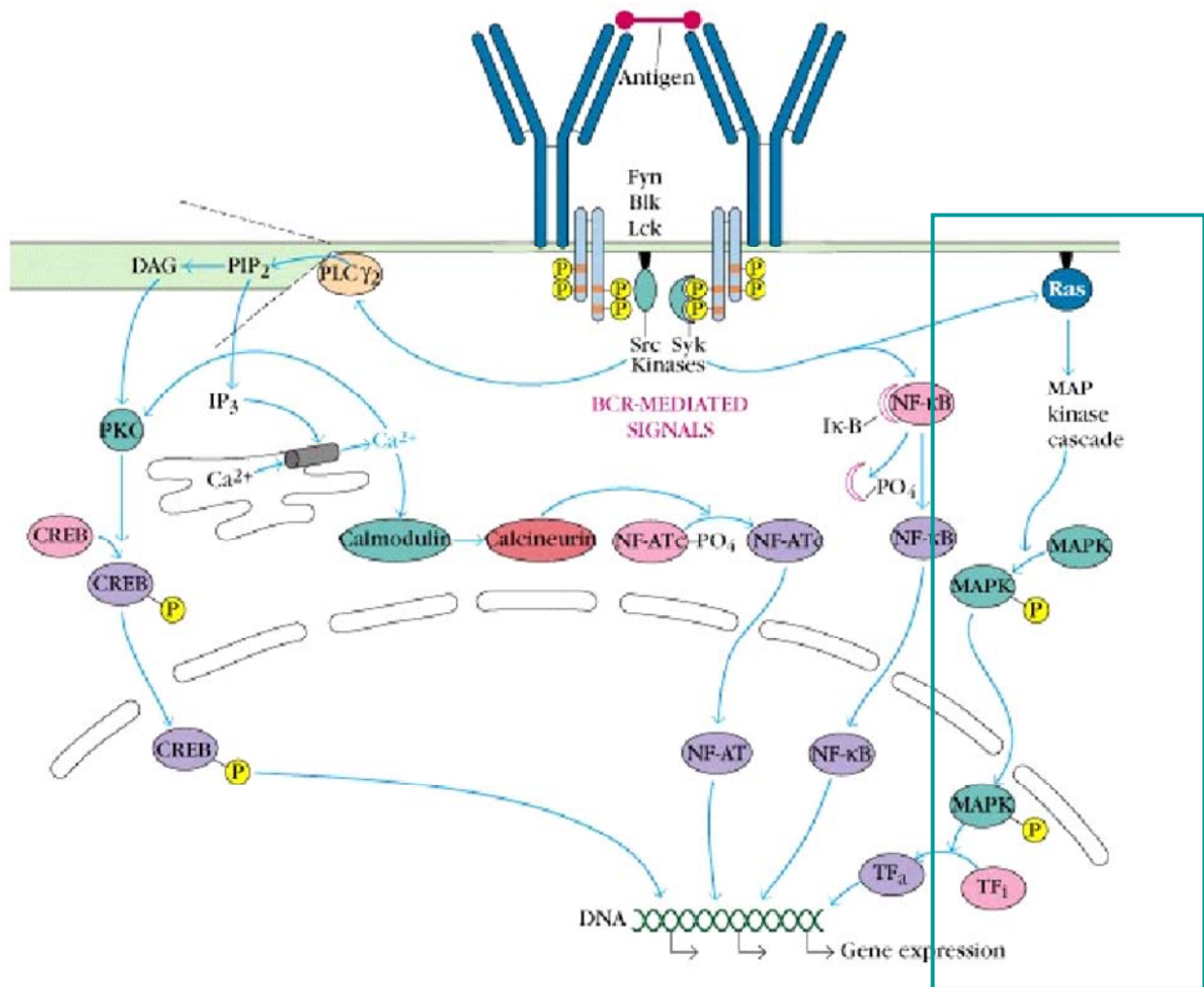


Figura 1: Modelo das vias de sinalização via ligação antígeno-BCR. A ligação ao BCR inicia a fosforilação de resíduos ITAM presentes nas caudas intracitoplasmáticas de Igα e Igβ por proteínas da família Src. A partir deste evento, diferentes vias de sinalização indicadas (ativação de PLCγ, PKC, via da calcineurina, MAPK e translocação de NFκB ao núcleo) são induzidas (adaptado de Goldsby, Kendt & Osborne, 2000).

A sinalização dos receptores de célula B pode ser amplificada pela presença de um complexo de co-receptores formado pelas moléculas CD19, CD21 e CD81, responsáveis pelo 2º sinal na ativação de linfócitos B (Matsumoto *et. al.*, 1991). A molécula CD19 é o primeiro componente da sinalização e permite a ligação com o CD21 e CD81. A molécula CD21 é conhecida como um receptor do complemento, sendo denominada também de CR2. Ela é capaz de se ligar ao produto C3d do complemento, induzindo assim a potencialização da imunidade adaptativa em células B e em células foliculares dendríticas, resultando na produção aumentada de anticorpos antígenos-específicos. A expressão de CD21 em células B permite um agrupamento com o BCR levando a um aumento da ativação dos linfócitos B

através do recrutamento da molécula CD19 (Rickert, 2005). No entanto, o CD19 não é requerido para a expressão de CD21, que é normalmente induzida de forma tardia durante a diferenciação de células B, na transição da medula óssea para a periferia (Rickert, 2005). A co-ligação do BCR ao complexo aumenta em muito a sinalização (Lankester *et. al.*, 1994). Nesse processo, a cauda citoplasmática de CD19 é fosforilada por tirosina-quinases associadas ao BCR, que leva a uma posterior ligação à família das Src.

Como pode ser observado na figura 2, a via ativada pelo complexo co-receptor da célula B, é iniciada pelo recrutamento e ativação de tirosinas quinases. A molécula Rac é ativada, assim como Ras, culminando na fosforilação da molécula Jnk (quinase-N-terminal Jun). Jnk fosforilado é translocado ao núcleo, sendo capaz de ativar o fator de transcrição Jun que, associado com Fos, forma o fator de transcrição AP-1, capaz de regular a expressão de muitos genes envolvidos na diferenciação celular (Davis, 2001).

1.8) Sinalização via MAPK

Uma das vias de sinalização do BCR é mediada por MAP quinases (MAPK) (destacada na figura 1). MAPK são um grupo de serinas/treoninas quinases altamente conservadas ao longo das espécies eucarióticas que regulam atividades celulares que variam entre expressão gênica, mitose, metabolismo e morte celular programada. As vias de MAPKs são ativadas através de uma cascata de eventos seqüenciais de fosforilação, começando pela fosforilação de MAPK quinases (MAPKK) em dois resíduos de serina por MAPK quinase quinases (MAPKKK). MAPKK ativadas então, fosforilam MAPKs nos resíduos adjacentes de treonina e tirosina no padrão molecular conservado Thr-X-Tyr

Três vias de MAPK foram bem caracterizadas em organismos vertebrados: quinase regulada por sinais extracelulares (MAPK/ERK1 e ERK2), proteína quinase ativada por estresse (p-38 MAPK) e a proteína ativada por estresse/ quinase c-Jun N-terminal (Garrington & Johnson, 1999).

Vários estímulos distintos, incluindo fatores de crescimento, citocinas, infecções virais, ligantes de receptores de proteína G ou carcinógenos são capazes de ativar vias de ERK1 e ERK2. Ambas as moléculas são componentes da etapa da cascata de fosforilação que inclui a MAPKKK Raf, a qual pode ser ativada pelo proto-oncogene Ras. Na figura 2 pode ser observada essa via de sinalização induzida pela ligação ao BCR. Nela, Raf transduz um sinal à molécula ERK através de uma fosforilação inicial e ativação da molécula MAPKK, MEK1/2, que fosforila ERK (Robinson & Cobb, 1997). A molécula ERK ativada é

translocada ao núcleo, onde é capaz de ativar uma variedade de fatores de transcrição, tais como Elk-1, c-Fos, c-Jun, fator nuclear IL-6, entre outros. A via de Ras é ativada tanto por fatores de crescimento quanto pelas citocinas IL-2, IL-3 e IL-5 (Borish & Steinke, 2003).

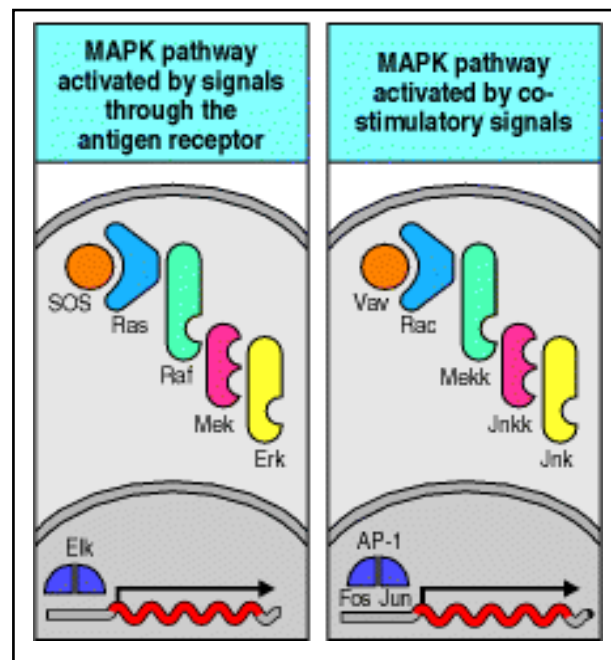


Figura 2: Iniciação da cascata de MAPK. Sinalização via receptores de antígenos, levam a ativação de moléculas SOS, o qual ativa a proteína G pequena Ras. Esta proteína ativa a cascata de MAPK, na qual Raf, Mek e Erk se ativam entre eles. Por fim, Erk fosforila e ativa o fator de transcrição Elk que, ao translocar para o núcleo, inicia a transcrição gênica do gene fos. A sinalização mediada pelo complexo co-receptor na célula B leva a ativação de outro fator de troca de nucleotídeos, Vav. Sua ativação inicia uma segunda cascata de MAPK levando a ativação seqüencial de Mekk, Jnkk e Jnk. Jnk, então, fosforila e ativa Jun, o qual, junto com Fos, forma o fator de transcrição AP-1 (Janeway *et al.*, 2003).

As proteínas JNK se ligam e fosforilam a proteína ligadora de DNA c-Jun, o que leva a um aumento da atividade transcricional. c-Jun é um componente do complexo de transcrição AP-1, um importante regulador de transcrição gênica, cujo outro componente, c-Fos, é transcrito a partir da translocação de Elk para o núcleo.

As moléculas p38 regulam a expressão de várias citocinas e são ativadas, em células do sistema imune, por citocinas pró-inflamatórias apresentando um importante papel na ativação da resposta imune. (Johnson & Lapadat, 2002).

1.9) Papel biológico da molécula CD81

O CD81 é um membro da família das tetraspaninas e sua localização em sinapse imunológica foi demonstrada tanto em células B quanto em T e em células NK. Tetraspaninas são glicoproteínas de membrana tipo III, evolutivamente conservadas, capazes de atravessar a

membrana plasmática quatro vezes, produzindo, assim, dois “loops” extracelulares; um pequeno e um grande denominados SEL (small extracellular loop) e LEL (large extracellular loop) respectivamente, além de formar pequenas regiões intracelulares. O primeiro, terceiro e quarto domínios transmembrana apresentam resíduos polares de função desconhecida e a maioria das tetraspaninas são modificadas a nível pós-transducional pela adição de palmitato a resíduos de cisteína (Hemler, 2005). A presença de resíduos citoplasmáticos altamente conservados de cisteína é uma marca adicional desta família de glicoproteínas (Levy & Shoham, 2005).

As tetraspaninas são conhecidas por apresentarem papel importante na patologia de doenças como malária, difteria e diversas infecções virais. No caso de infecções virais o papel de tetraspaninas parece estar associado desde a etapa de ligação inicial do vírus com a célula alvo até a liberação de novas partículas infecciosas. Entretanto, a relação destas proteínas com vírus parece envolver mecanismos complexos, provavelmente com a participação de outras moléculas (Martin, *et. al.*, 2005). Membros da família de tetraspaninas são capazes de interagir umas com as outras e também com outras moléculas acessórias formando assim complexos multimoleculares denominados “redes de tetraspaninas”. As duas maiores moléculas acessórias envolvidas em complexos primários com o CD81 são EWI-F (também denominada CD9P-1, FPRP ou CD315) e EWI-2 (também denominada PGRL, IgSF8 ou CD316), que pertencem a um novo grupo de proteínas da superfamília das imunoglobulinas (Stipp *et al.* 2003).

A molécula de CD81 faz parte do complexo co-receptor de célula B, sendo capaz de interagir com a molécula CD19 em células B e com as moléculas CD4 ou CD8 em células T. Sua associação com o CD19 se dá através da sua porção extracitoplasmática, enquanto outra interação se dá com o domínio intracitoplasmático da molécula EWI-2 (Stipp *et. al.*, 2003). No entanto, sua função em termos de sinalização celular ainda não está clara. Foi observado que células que perderam a molécula de CD81 expressaram níveis diminuídos de CD19 na superfície, o que é atribuído a sua instabilidade na membrana plasmática, levando a crer que CD81 possa estar conferindo uma estabilidade ao complexo co-receptor nas células B (Shoham, *et. al.*, 2003).

O papel do CD81 na ativação das células B pode ser evidenciado em um estudo onde se observou que linfócitos murinos, cujo CD81 foi depletado, desenvolviam-se normalmente, porém apresentavam respostas proliferativas alteradas e deficiência na produção de anticorpos, demonstrando que o CD81 é um dos receptores essenciais para a produção de anticorpos (Maecker & Levy, 1997; Miyazaki, Müller & Campbell, 1997). Como pode ser

observado na figura 3, a regulação da proliferação mediada por CD81 é positivamente associada com a ativação de quinases pertencente à cascata de MAPK, tais como ERK, JNK e p38 (Carloni, Mazzocca & Ravichandran, 2004; Hemler, 2005). Foi observado que CD81 é capaz de se ligar a PI4K levando a um aumento na síntese de fosfoinosítídeos culminando no recrutamento das isoformas p46 e p52 da proteína adaptadora Shc, o que promove a ativação da cascata de MAPK mediada por fosforilação da molécula Ras culminando nos eventos de proliferação e apoptose celular. Apesar do papel de CD81 em sinalização celular, não há uma função específica relacionada à molécula na ausência de CD19.

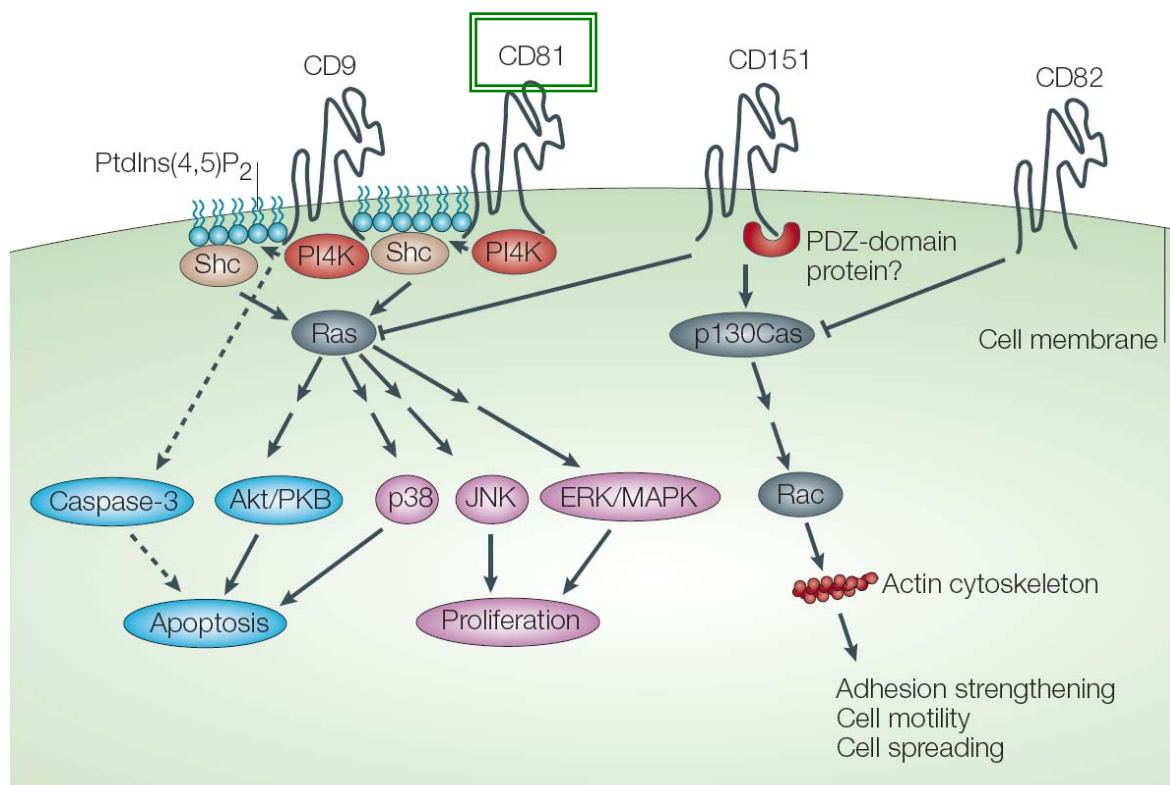


Figura 3: Cascata de ativação de linfócitos B iniciada por tetraspaninas. CD81 (e CD9) associam-se com fosfatidilinositol 4-quinase (PI4K), que localmente produz fosfoinosítídeos. Isto causa o recrutamento e ativação de Shc. Posteriormente, a ativação de Erk, p38 e Jnk mediadas por Ras levam a eventos de proliferação e apoptose. A ativação de caspase-3 também podem contribuir para a regulação da apoptose dependente de CD9. Sinalização através de CD151 pode regular negativamente a sinalização via MAPK/Erk e PKB de maneira dependente de adesão celular. CD151 ativa preferencialmente Rac, levando a uma regulação do citoesqueleto, espriamento celular e motilidade. CD82 é capaz de suprimir a invasão de células tumorais por regulação negativa da molécula p130Cas e, então, levar a uma diminuição da ativação de Rac (Hemler, 2005).

Tem sido observado em alguns modelos que o engajamento do receptor CD81 é capaz de levar a uma ativação de linfócitos B na ausência de uma co-ligação ao BCR. Um exemplo dessa ativação é a interação entre o vírus da hepatite C (HCV) e células B. Já foi demonstrado

que a molécula CD81 age como um receptor para a proteína E2 do envelope do HCV e este sítio de ligação foi mapeado num epítipo localizado no interior da hélice do CD81, que está em grande proximidade com as pontes dissulfeto no LEL (Higginbottom, *et. al.*,2004). Recentemente foi descrito que a ligação de E2 de HCV ao CD81, além de ser importante para a infecção celular (Flint, *et al.*, 1999), induz ativação de linfócitos B na ausência de uma co-ligação ao BCR e CD19. A ativação mediada por CD81 difere de outros estímulos policlonais ao linfócito B e induz preferencialmente uma proliferação de linfócitos B naïve (Rosa, *et al.*, 2005). O HCV, assim como o vírus da dengue, pertence à família *Flaviviridae*, o que sugere que o DV possa ser capaz de infectar e ativar linfócitos B por via semelhante à apresentada pelo HCV. No caso do vírus da dengue essa interação é pouco conhecida e é objeto do estudo aqui apresentado.

1.10) Racional da Dissertação

Diversos estudos apontam para um papel importante dos linfócitos B na patogenia da dengue. A ativação dessas células em decorrência da infecção leva a produção de citocinas, ou produção de anticorpos e formação de imunocomplexos, como ocorre nos casos de potencialização em uma infecção secundária pelo vírus da dengue. Além disso, a presença de autoanticorpos também tem sido demonstrada na infecção com o vírus e pode ser resultado de uma ativação exacerbada desse tipo celular. No entanto, os mecanismos de interação do vírus com os linfócitos B, levando tanto a infecção quanto a ativação ainda não foram caracterizados, bem como não se conhece um receptor(es) específico(s) responsável por essa interação. Visto que a maior parte dos dados obtidos até o momento é proveniente de observações clínicas e epidemiológicas indiretas, um estudo detalhado dos efeitos do vírus ou de seus produtos sobre mecanismos de ativação dos linfócitos B e sobre mecanismos de interação entre linfócitos B e outros tipos celulares seria uma ferramenta importante para elucidar determinadas etapas da patogenia de dengue.

II) OBJETIVOS

II. 1) Objetivo Geral

Determinar a susceptibilidade de linfócitos B humanos ao vírus da dengue e avaliar se a interação entre essas células e o vírus resulta em ativação celular, caracterizando alguns dos mecanismos envolvidos nessa ativação.

II. 2) Objetivos específicos

1. Analisar a susceptibilidade e permissividade de linfócitos B humanos a infecção pelo vírus da dengue
2. Verificar se há modulação na produção de imunoglobulina mediada pelo vírus da dengue *in vitro*.
3. Verificar o papel de infecção celular produtiva na modulação da ativação de células B.
4. Investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas na ativação dos linfócitos B humanos pelo vírus da dengue.
5. Verificar o papel da molécula CD81 na modulação da produção de Ig pelo DV
6. Estudar o papel de outros tipos celulares ou mediadores solúveis na ativação de células B induzida pelo vírus

III) MATERIAIS E MÉTODOS

III. 1) Vírus

Amostra de vírus dengue 2 (cepa Jamaica) (DV2) (Deubel, Kinney & Trent, 1988) foi gentilmente cedida pela Dr. Claudia N. Duarte dos Santos, IBMP, Paraná.

Amostra de dengue 1 (DV1) provenientes de isolados de pacientes foi obtida do Laboratório Central Noel Nutels (LACEN) do Rio de Janeiro e cedida pela Dra. M. Teresa Villela Romanos (IMPPG-UFRJ).

As amostras de vírus foram propagadas através de inoculação em células da linhagem C6/36, derivadas de mosquito *Aedes albopictus*. Essas células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 e meio Leibovitz L-15 (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 5% soro fetal bovino (Sigma Chem Co; St Louis, MO, EUA) e 10 µg/ml de gentamicina (Sigma Chem Co), a 28°C, em ambiente com 5% de CO₂. Para manutenção e propagação do vírus da dengue, as amostras foram inoculadas em cultura de células C6/36, em meio contendo 5% SFB, utilizando-se multiplicidade de infecção (MOI) de 1. Após constatação de efeito citopático (CPE), observado após 7-10 dias de cultura, os sobrenadantes das culturas contendo vírus foram recolhidos e estocados em freezer à -70°C.

Em alguns experimentos foram utilizados vírus inativados por calor. Para isso, as amostras virais foram incubadas por uma hora em banho-maria a 56°C. A inativação foi avaliada após inoculação das amostras em células C6/36 e verificação de ausência de CPE. A inativação foi confirmada, ainda, por ensaio de RT-PCR (metodologia descrita a seguir) nos lisados de células inoculadas.

III. 2) Titulação viral

Para titulação das amostras virais, células C6/36 foram plaqueadas em placas de 96 orifícios (em sextuplicata) na concentração de $2,5 \times 10^4/100\mu\text{l}$ /poço e incubadas “overnight” para aderência. Em seguida, diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) dos diferentes sorotipos de vírus foram feitas em meio sem soro e 20 µl de cada diluição foi inoculado sobre a cultura de células. Após 7-10 dias, as culturas foram analisadas, e o título viral foi determinado através da observação de efeito citopático (CPE) e calculado de acordo com o método de Reed & Muench (Reed & Muench, 1938).

III. 3) Obtenção de linfócitos B humanos

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e linfócitos B purificados foram obtidos de amostras de sangue de doadores saudáveis provenientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ). Para verificar se os doadores já haviam entrado em contato com o vírus, foi feita a dosagem de IgG em soro destes indivíduos através de um teste ELISA indireto de acordo com o protocolo do fabricante (Kit PanBio Medivax).

O sangue foi diluído em PBS na proporção 1:1 e posteriormente submetido à centrifugação em gradiente de Ficoll-Hystopaque (Sigma Chem Co, St Louis MO, EUA), na proporção de 1:2 (Ficoll: Sangue), a 2000rpm/30min. A camada de células mononucleares (PBMC) foi recolhida da superfície do gradiente e as células foram lavadas 3x em salina de Hank's e ressuspendidas em meio RPMI 1640, acrescido de l-glutamina (2mM), β -mercaptoetanol (50 μ M), gentamicina (10 μ g/ml), e 10% SFB (meio completo). As células foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade foi determinada utilizando-se corante vital azul de Trypan.

A purificação de linfócitos B foi realizada por seleção negativa utilizando-se o sistema MACS (Miltenyi Biotec, Alemanha). Em resumo, as células mononucleares foram centrifugadas, lavadas com PBS e incubadas com coquetel de anticorpos (anti-CD2, CD14, CD16, CD36, CD43, CD235) conjugados a biotina, utilizando-se 10 μ l/10⁷ células. Após incubação de 10 minutos a 4°C, foram adicionadas microesferas magnéticas cobertas com anticorpo anti-biotina (20 μ l/10⁷ células), por 15 minutos/4°C. Por fim, foi realizada uma separação magnética, onde as células foram passadas por uma coluna submetida a um campo magnético. Os linfócitos B, que não se ligam aos anticorpos utilizados no coquetel, não ficaram aderidos à coluna magnética, passando diretamente por ela. Estes linfócitos purificados foram então contados e ressuspendidos em meio completo. Para confirmação da purificação dos linfócitos B, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD19 (conjugado a FITC) na concentração 2,5 μ g/mL (Sigma Chem Co, St Louis MO, EUA) e analisadas por citometria de fluxo (FACS).

Foi também utilizada a linhagem de linfoma B humano DAUDI (ATCC, Rockville, MD, EUA). As células foram cultivadas em meio RPMI completo e mantidas a 37°C em ambiente de 5% de CO₂.

III. 4) Análise da infecção de linfócitos B pelo vírus da dengue

PBMCs, linfócitos B purificados, ou células Daudi (ATCC, Rockville, MD, USA) foram plaqueados em placas de 24 poços na concentração 5×10^5 células/500 μ L/poço por 2h na presença de meio, mock (sobrenadante de células C6/36 não infectadas) ou DV2 em diferentes MOIs. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e novamente plaqueadas com meio RPMI completo por 48h a 37°C/5%CO₂. A infecção foi analisada posteriormente por citometria de fluxo, como descrito abaixo.

Alternativamente, linfócitos B, células DAUDI ou células C6/36 foram plaqueados na concentração 1×10^6 células/ 2mL/ poço e inoculados com DV2 em MOI de 1 ou de 10. Após incubação de 2h a 37° / 5% de CO₂, as células foram lavadas e cultivadas em meio completo, por 48h a 37° / 5% de CO₂. Em seguida, pellet e sobrenadantes foram recolhidos e a infecção foi analisada por RT-PCR, como descrito a seguir.

III. 4.1) Análise da infecção por citometria de fluxo

As células infectadas foram recolhidas, lavadas 1x com PBS e fixadas com 4% paraformaldeído, por 10 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram tratadas com PBS + 1% SFB + 2% soro de camundongo por 15 minutos a temperatura ambiente, a fim de se evitar a ligação inespecífica do anticorpo. Para marcação da população de linfócitos B, as células foram incubadas por 30 minutos com anticorpo anti-CD19 conjugado a PE (Sigma Chem Co, St Louis MO, EUA; 2,5 μ g/mL). Para marcação de vírus da dengue intracelular, as células foram permeabilizadas com 0,1% de saponina, por 15 min em temperatura ambiente e então, lavadas 1x com PBS. Em seguida, as células foram incubadas com soro hiperimune de camundongos anti-DV2 (gentilmente cedido pela Dra. Cláudia N D dos Santos, IBMP, Paraná), diluído 1:50 em PBS acrescido de 1% SFB e 0,1% de saponina. Após 1 hora, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo anti-Ig de camundongo conjugado a Alexa Fluor488 (Molecular Probes, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), usado na concentração 10 μ g/mL em PBS acrescido de 1% SFB. A proporção de células infectadas foi determinada através de análise em citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento FACScalibur (Becton Dickson Immunocytometry System, EUA). Foram adquiridos 10000 eventos e as análises foram realizadas utilizando-se o programa CellQuest.

III. 4. 2) Análise da infecção por RT-PCR

III. 4. 2. 1) Extração de RNA viral

Os sobrenadantes e os pellets das células infectadas foram recolhidos e foi realizada a extração do RNA viral utilizando o kit RNAagents Total RNA Isolation System (Promega Corporation, WI, EUA), de acordo com protocolo a seguir. Inicialmente, 300µL do sobrenadante ou de pellet de células previamente resuspendido em água, foram adicionados a 300µL de solução desnaturante e 30µL de solução de acetato de sódio 2M pH 4,0. O material foi homogeneizado por inversão do tubo de 3 a 5 vezes e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 300µL da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, sendo tudo novamente homogeneizado por inversão por 3 a 5 vezes, sendo posteriormente agitado em vortex por 10 segundos. A amostra foi incubada em gelo por 15 minutos e centrifugada a 13000 rpm durante 20 minutos. A fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para um novo tubo enquanto o DNA e as proteínas permaneceram na fase orgânica e na interface. Posteriormente foi adicionado um volume de isopropanol equivalente ao volume transferido, incubando-se a mistura a -20°C por, pelo menos, 5 minutos, para que houvesse a precipitação do RNA. Um melhor rendimento da extração de amostras com baixa quantidade de RNA foi obtido realizando a precipitação por 30 minutos. O material obtido foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi, então, resuspendido em 1mL de etanol 75% gelado e centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante. Logo em seguida, deixou-se o RNA secar em ambiente livre de RNases durante 5 a 20 minutos. O RNA foi resuspendido em 50 µL de água destilada estéril, livre de nucleases, e a amostra foi estocada a -20°C até que fosse processada.

III. 4. 2. 2) RT-PCR

A reação de transcrição reversa (RT) foi feita de acordo com o protocolo de ImProm-II da Promega. Inicialmente, 5µL de RNA foram misturados com 1µL de DMSO, aquecidos a 97°C por 5 minutos e a mistura foi resfriada para 4°C por, pelo menos, 1 minuto. Em seguida, foram adicionados os reagentes para a reação de RT: 1µL de H₂O, 2µL de tampão RT 5x, 1,2µL de MgCl₂ 25mM, 0,2µL de Random primers (Invitrogen, CA, USA) e 0,2µL de RT

(Promega Corp., WI, USA). A reação foi, então, submetida ao ciclo de hibridização (25°C por 5 minutos) e transcrição reversa (42°C por 45 segundos). Após o ciclo de transcrição reversa, foram acrescentados 20µL da seguinte mistura de PCR: 0,5µL de dNTP 10µM, 4µL de tampão 5x, 2,4µL de MgCl₂ 25mM, 0,2µL dos primers de dengue T1 (TCATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG) e T2 (TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC), 0,2µL de Taq polimerase Promega e 12,7µL de água. A mistura foi colocada no termociclador e submetida aos ciclos de aquecimento (95°C por 15 segundos), 40 ciclos do PCR (94° por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos) e extensão (72°C por 5 minutos) (Lanciotti *et. al.*, 1992).

O cDNA amplificado foi aplicado em gel de agarose 1%. A corrida eletroforética foi feita a 110V por 35 minutos. Em seguida, o gel foi imerso em brometo de etídeo durante 15 minutos, agente intercalante de bases que foi revelado em transiluminador com lâmpada ultravioleta (UV).

III. 5) Dosagem de imunoglobulinas por ELISA

Os linfócitos B purificados ou PBMC foram plaqueados, em triplicata, em placas de 96 orifícios de fundo chato, na concentração de 2×10^5 células/100µl/poço. A infecção com vírus da dengue foi realizada pela inoculação de 20 µl de sobrenadante de células C6/36 infectadas em diferentes diluições, caracterizando MOI de 0,1 a 10. Como controle negativo, foi utilizado meio completo ou sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock). Como controles positivos foram utilizados o PWM (10 µg/ml; Sigma Chem Co, St Louis MO, EUA) para avaliar a ativação de PBMC, e Sac (Proteína A de parede celular de *S. aureus* cepa Cowan, Sigma Chem Co, St Louis MO, EUA), na concentração 1µg/mL, para avaliar a ativação de linfócitos B purificados. Em alguns experimentos, inibidores específicos de MAPK foram também adicionados as culturas. Foram utilizados os inibidores: PD98059 (inibidor de fosforilação de Erk), nas concentrações 30µM e 10µM; SB203580 (inibidor de fosforilação de p38), nas concentrações 10µM e 5µM. Em outros experimentos, as células foram estimuladas na presença ou ausência de anticorpo anti-CD81, na concentração 1µg/mL (Alpha Diagnostic Intl. Inc., San Antonio, Texas, EUA). Após 15 dias de cultura, os sobrenadantes das culturas de linfócitos B e PBMC foram recolhidos e a concentração de IgM e IgG secretadas foi avaliada por ELISA de captura (Snapper & Paul, 1987). Placas de ELISA de poliestireno de fundo chato (Corning, NY, EUA) foram cobertas com anticorpo anti-IgG e

anti-IgM humanas (Sigma Chem Co, St Louis MO, EUA) diluído em PBS, a 5 µg/ml, e incubadas “overnight” a 4⁰C. As placas foram lavadas 3x com água destilada e, então, bloqueadas com PBS + 1% SFB, por 2h a 37⁰C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e os sobrenadantes foram adicionados em diluição seriada (1:1 a 1:125) em PBS + 1% SFB, e as placas foram incubadas “overnight” a 4⁰C. Após nova lavagem, foram adicionados anticorpos específicos para os isotipos IgM e IgG, conjugados a fosfatase alcalina (BioSource Int., Camarillo, CA, EUA) e diluídos em PBS + 1% SFB, na concentração de 1 µg/ml. A ligação do anticorpo foi medida pela adição do substrato cromogênico paranitrofenolfosfato (PNPP, 1mg/ml; Sigma Chem Co, St Louis MO, EUA) e a leitura foi feita em leitor de microplaca modelo 505 (BioRad, Boston, MA, EUA) para a determinação da A450nm. As concentrações de Ig foram determinadas a partir de curvas padrão construídas com Ig humana purificada.

III. 6) Avaliação da viabilidade celular

Para confirmação de que a concentração tanto do anticorpo anti-CD81 quanto de inibidores de quinases a serem utilizados nos experimentos não estariam induzindo os linfócitos B a morte, avaliamos a viabilidade destas células na presença de ambas as moléculas. Para isso, linfócitos B foram plaqueados na concentração 5×10^6 células/500µL/poço em placa de 24 poços e incubados com o anticorpo anti-CD81 (1µg/mL) ou inibidores de quinase PD98059 (30µM e 10µM) e SB203580 (10µM e 5µM) por 48h a 37⁰C. Após esta incubação, as células foram tratadas com iodeto de propídeo (PI) (5µL/10⁶células, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 20 minutos, sendo a proporção de células mortas posteriormente avaliada por citometria de fluxo.

III.7) Avaliação da secreção de IL-6 por linfócitos B na presença de DV

Linfócitos B purificados foram plaqueados na concentração 2×10^5 células/200µL/poço em placa de 96 orifícios na presença dos controles negativos (meio e mock), controle positivo (Sac) e de DV2 (MOI=1) por 24h, 48h e 72h. Após os diferentes tempos de incubação, os sobrenadantes de culturas de linfócitos B foram recolhidos e o nível de secreção de IL-6 foi avaliado através do Kit Human IL-6 (Interleukin-6) ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, San Diego, USA). Placas de ELISA de poliestireno de fundo chato

(Corning, NY, EUA) foram cobertas com anticorpo de captura anti- IL-6 humana diluído em tampão de captura e incubadas “overnight” a 4⁰C. As placas foram lavadas 5x com PBS + 0,05% Tween-20 e, então, bloqueadas com tampão de diluição por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e os sobrenadantes das culturas foram adicionados em diluição seriada (1:1 a 1:125), em tampão de diluição, e as placas foram incubadas “overnight” a 4⁰C. Após nova lavagem, foi adicionado anticorpo anti-IL-6 humana conjugado a biotina na concentração de 1 µg/ml. Após incubação de 2 h, a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas, e incubadas com a enzima avidina-HRP por 30 minutos a temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi adicionada a solução de TMB 1x por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionada a solução de parada (2N H₂SO₄) em cada poço. A leitura foi feita em leitor microplaca modelo 505 (BioRad, Boston, MA, EUA) para a determinação da A450nm. A concentração de IL-6 foi determinada a partir de curva padrão construída com IL-6 humana recombinante (1µg/mL).

III. 8) Análise da fosforilação de proteínas intracelulares por western blotting

III. 8. 1) Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita para normalização das amostras que foram analisadas por western blotting, utilizando o kit DC Protein Assay II (BioRad, CA, USA). Inicialmente foi feita uma curva padrão de BSA a partir de 1,5 mg/mL a 0,2mg/mL através de 6 diluições seriadas em tampão de baixa salinidade (10mM Tris-Cl pH 7,5; 5mM de EDTA pH 8,0; 150mM NaCl; 0,1% NP-40). A um volume final de 5µl de amostra ou padrão, foram adicionados 25µL de reagente A' (reagente S adicionado ao reagente A na proporção 1:50) e 200 µL de reagente B (Kit BioRad), exatamente nesta ordem em placa de 96 orifícios de fundo chato. A reação foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, as amostras e o padrão foram analisados em espectrofotômetro com filtro de 650 – 750 nm.

III. 8. 2) Western Blotting

Células DAUDI ou linfócitos B foram plaqueados na concentração de 3x10⁶ células / 2mL / poço, em duplicata, em placas de 6 orifícios. Em seguida, as células foram infectadas com DV2 na sua forma nativa ou inativada (MOI=1). Como controle negativo, as células

foram cultivadas apenas com meio de cultura ou sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock). Após diferentes períodos de tempo de infecção, as células foram lisadas com tampão de baixa salinidade (10mM Tris-Cl pH 7,5; 5mM de EDTA pH 8,0; 150mM NaCl; 0,1% NP-40) por 30 minutos a 4°C. Em seguida, os lisados foram clarificados por centrifugação a 13000g por 1 min. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (SDS 5X) sendo normalizadas de acordo com a concentração de proteínas totais, como descrito previamente. As amostras e o padrão de peso molecular foram aplicados em gel de SDS-PAGE 12%. A corrida eletroforética foi feita a 80V durante 2 horas. Em seguida, foi realizada uma transferência do gel para membrana Nitrocelulose ou PVDF (Pierce – Milipore, Rockford, USA), “overnight” (ON) em cuba úmida. As membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (TBS Tween 0,1% + Leite Desnatado Mólico 5% por 1 hora em temperatura ambiente (TA). Em seguida, as membranas foram incubadas ON com anticorpo primário diluído em TBS Tween 0,1% + 5% BSA a 4°C, sob agitação. Os anticorpos utilizados como primários foram o 4G10, que reconhece moléculas de tirosina fosforiladas (usado na diluição 1:10000, ATCC, Rockville, MD, EUA), IgG de coelho anti-pERK (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), que reconhece moléculas de ERK fosforiladas, utilizado na diluição 1:2000, e IgG de camundongo anti pp38 que reconhece moléculas de P38 fosforiladas (utilizado na concentração 1:500, Santa Cruz Biotechnology). Também foram realizados ensaios utilizando os anticorpo de coelho anti-ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) na diluição 1:1000, a fim de se confirmar se a quantidade de proteína em cada amostra era semelhante. As membranas foram lavadas 3 vezes com TBS Tween 0,1% (3x) e, em seguida incubadas com anticorpo anti-Ig de camundongo ou de coelho conjugados a peroxidase (Jackson Immunoresearch, PA, EUA) nas diluições variando de 1:5000 a 1:10000 diluídos em TBS Tween 0,1% + BSA 5%, durante 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi lavada novamente por 10 minutos com TBS Tween 0,1% (3x). A membrana foi então revelada em câmara escura, utilizando-se um sistema de quimiluminescência (SuperSignal, Kodak) e papel fotográfico (Kodak).

III. 9) Análise do papel de outros tipos celulares ou mediadores solúveis na ativação de linfócitos B induzida pelo DV

Para verificar se outros tipos celulares seriam capazes de modular a ativação das células B induzida pelo vírus, os experimentos de análise da produção de Ig foram realizados com PBMC total, em vez de células purificadas. Adicionalmente, foi avaliado o efeito de da

adição de citocinas exógenas e de sobrenadantes de monócitos infectados sobre a ativação de linfócitos B purificados.

III.9.1) Análise do papel de monócitos na ativação de linfócitos B induzida pelo DV

Para obtenção de monócitos humanos, PBMCs foram incubadas por 2h/37⁰C para aderência. Em seguida, a população de células não aderentes foi removida e utilizada para purificação de linfócitos B. As células aderentes (monócitos) foram cultivadas com DV1 (MOI=0,1) ou sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock) por 48h/37⁰C em atmosfera de 5% de CO₂. Os sobrenadantes dessas culturas foram recolhidos e adicionados sobre cultura de células B. Culturas paralelas foram realizadas com as células B na presença do vírus ou Mock. Após 15 dias de cultura, os sobrenadantes foram recolhidos e foi realizada a dosagem de IgM e IgG por ELISA de captura, como descrito previamente.

III. 9.2) Análise do papel de IL-6 na modulação da ativação de linfócitos B mediada pelo DV

Linfócitos B purificados foram incubados na presença dos controles negativos (meio e mock), controle positivo (Sac) ou dos vírus DV2 e DV1 em MOIs de 1 e 0,1. Em alguns poços foi inoculada IL-6 recombinante humana (BioSource, Camarillo, CA, USA) na concentração de 20ng/mL. Após 15 dias de cultura, foi feita a dosagem de imunoglobulinas secretadas como previamente descrito.

III.10) Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados aplicando o Teste t de Student utilizando o programa *GraphPad Prism5*. Foram considerados estatisticamente significativos valores com $P \leq 0,05$.

IV) RESULTADOS:

IV. 1) Análise da infecção de linfócitos B pelo DV

Para avaliar a infecção das células B em nosso modelo de estudo, foi cultivado PBMC na presença de DV2, num MOI de 1, e a proporção de células infectadas foi avaliada por citometria de fluxo (FACS). Durante as análises, foram feitos 2 diferentes “gates” em populações com características de linfócitos e monócitos, de acordo com os parâmetros FSC e SSC (Figura 1A). Foi observado que o DV2 é capaz de infectar cerca de 2-3% da população de linfócitos (Figura 1B), uma proporção muito inferior àquela apresentada por monócitos (Figura 1C), conhecidos como uma das principais células alvos do vírus da dengue. Além disso, foi avaliado se a população de linfócitos infectada pelo vírus era de linfócitos B. Para isso, as células foram infectadas (DV2 MOI=10 e 0,1) e duplamente marcadas com anticorpos anti-DV e anti-CD19, sendo então analisadas no FACS. Na figura 1D, observamos que cerca de 2% das células eram duplo positivas (CD19⁺ e DV⁺), proporção similar àquela verificada previamente na população PBMC. Para confirmar o resultado obtido, linfócitos B foram purificados de PBMC, através de seleção negativa, utilizando sistema de separação magnética (MACS). As células B purificadas foram cultivadas com DV2, por 48h e a infecção foi novamente avaliada por citometria de fluxo e o nível de infecção observado se mostrou, de fato, semelhante ao encontrado na população de PBMC (Figura 1E-F).

A infecção celular foi avaliada também por RT-PCR. Para isso, tanto linhagem de células DAUDI quanto linfócitos B purificados foram infectados com DV2 em MOI=1 por 48h. Em seguida, foi feita a extração do RNA viral nos pellets e sobrenadantes das culturas, e a presença do genoma de DV foi avaliada através de RT-PCR. Observando as células DAUDI na figura 2A, detectamos a presença do RNA viral no pellet (linha 2) e, em menor escala, no sobrenadante destas células (linha 3). Já com linfócitos B purificados, observamos RNA viral apenas na amostra de pellet infectado (Figura 2B, linha 2). Uma vez que detectamos tal diferença entre linhagem de células B e célula B purificada, adicionamos um maior MOI à cultura de células B (MOI=10) e, dessa forma, foi possível detectar a presença de RNA viral tanto no pellet quanto nos sobrenadantes da linhagem e de células purificadas (Figura 2B, linhas 6 e 7). Tal resultado demonstra que o vírus da dengue é capaz de infectar células B, se replicar no interior destas células e, assim, novas partículas são secretadas no meio de cultura. Para avaliar se os vírus secretados eram infecciosos, os sobrenadantes foram adicionados a culturas de células C6/36, sabidamente alvos para o vírus da dengue. Após 48h de cultura

analisamos a presença do genoma viral no pellet e sobrenadante de células C6/36 por RT-PCR e não notamos a presença de RNA viral quando utilizamos MOI de 1 (Figura 2 linhas 4 e 5) ou de 10 (Figura 2, linhas 8 e 9). Tal resultado sugere que as partículas virais secretadas por linfócitos não são capazes de infectar novas células, não sendo, então infecciosas.

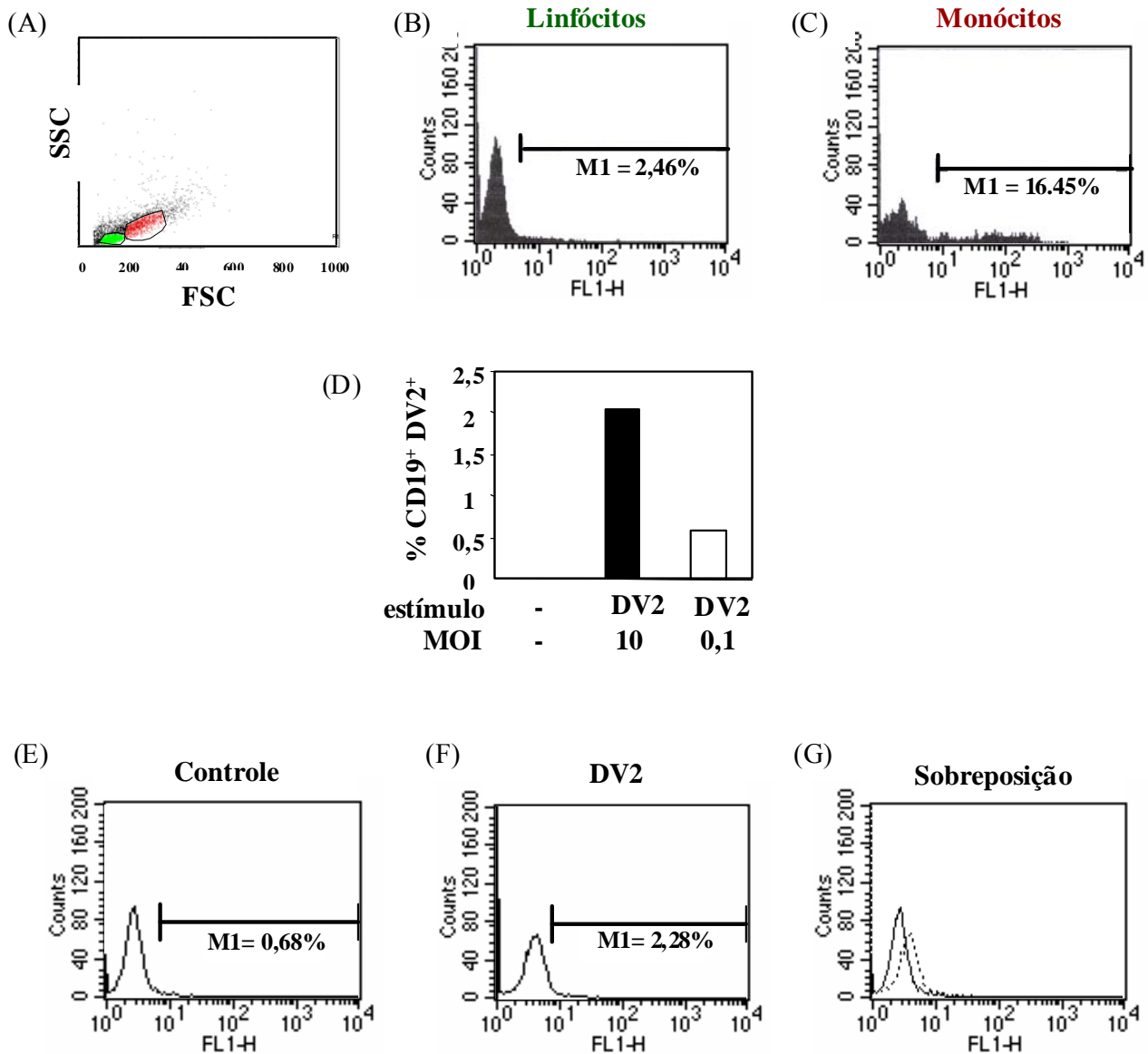
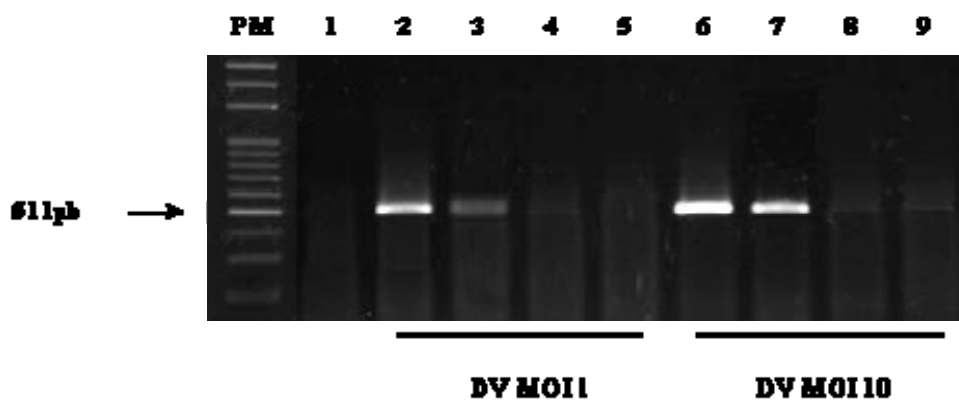


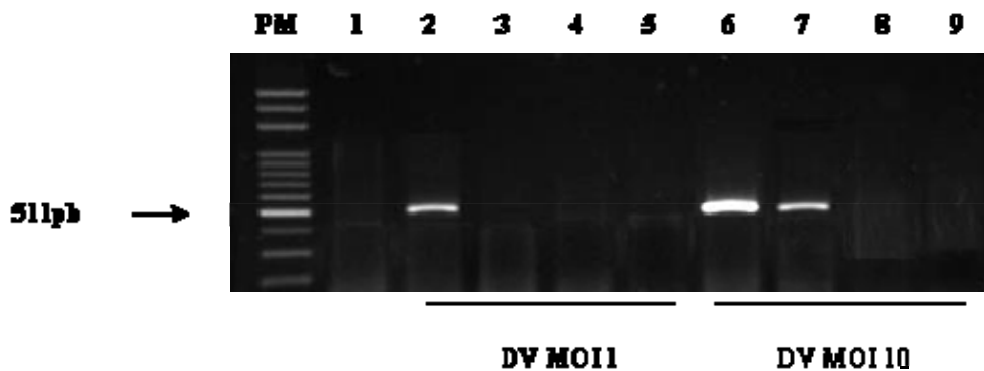
Figura 1: Análise da infecção de linfócitos B pelo DV. PBMC (A-D) e linfócitos B purificados (E-G) foram infectados com DV2 (MOI=1). Após 48h de cultura, as células foram recolhidas e marcadas com anticorpo anti-DV2, seguido de marcação com anticorpo anti-Ig de camundongo conjugado a AlexaFluor488. Em A está representado o gráfico de FSC x SSC e a seleção do “gate” que delimita a população de linfócitos (verde, G1) e de monócitos (vermelho, G2). Em B está demonstrada a população de linfócitos (G1) DV2⁺ e em C, a

população de monócitos (G2) DV2⁺. Em D, PBMCs foram cultivadas com meio de cultura ou DV2 (MOI=10 e 0,1). As células foram recolhidas e marcadas com anticorpo anti-CD19 conjugado a PE e com anticorpo anti-DV2, como descrito anteriormente. As barras indicam a proporção de células DV⁺ na população de células CD19⁺. Em E é mostrado o histograma obtido com linfócitos B purificados não marcados (controle); Em F é mostrada a população de linfócitos B purificados DV2⁺. O gráfico G indica a sobreposição dos gráficos E e F, onde linha inteira mostra o controle e a linha pontilhada mostra as células infectadas. M1 indica a porcentagem de células DV⁺.

(A)



(B)



1 → ctrl negativo 4 → pellet C6/36 + sbnt LB 7 → sbnt LB
 2 → pellet LB 5 → sbnt C6/36 + sbnt LB 8 → pellet C6/36 + sbnt LB
 3 → sbnt LB 6 → pellet LB 9 → sbnt C6/36 + sbnt LB

Figura 2: Análise da infecção de linfócitos B por RT-PCR. Células DAUDI (A) e linfócitos B purificados (B) foram incubados com meio de cultura (controle negativo) e DV2, nos MOIs de 1 e 10 por 48 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas e tanto o sobrenadante quanto o pellet foram utilizados para extração de RNA viral. O sobrenadante de

linfócitos B foi incubado com células C6/36 por 48h. Após este tempo, as células foram centrifugadas e foi extraído o RNA viral do pellet e sobrenadante de tais células. A análise da infecção de linfócitos e C6/36 foi feita por RT-PCR, como descrito em materiais e métodos.

IV. 2) Análise da secreção de IgM por PBMC

Após a análise da infecção de linfócitos B pelo vírus da dengue, foi avaliada a capacidade do vírus induzir uma ativação destas células através da secreção de imunoglobulinas do isotipo IgM. Foram comparados os níveis de secreção de Ig induzidos por dois sorotipos virais. Para isso, as células mononucleares foram cultivadas com DV2 ou DV1, com sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock) ou com meio de cultura (controles negativos), ou com PWM (controle positivo). Após 15 dias de cultura, o sobrenadante foi coletado e foi feita a dosagem de IgM por ELISA. Como pode ser observado na figura 3, a cultura com DV induziu um aumento na secreção de IgM. Dentre 8 doadores analisados, 6 apresentaram aumento da secreção de Ig. Para avaliar se os doadores já haviam tido contato prévio com o vírus, foi realizado ensaio de ELISA para detecção de IgG nos plasmas obtidos dos mesmos doadores. Como a grande maioria dos doadores apresentaram IgG específica pra dengue, nesse momento não separamos os doadores entre positivos e negativos. Entretanto, pudemos observar que pelo menos uma amostra de doador com sorologia negativa pra dengue também apresentou aumento na secreção de IgM na presença do vírus.

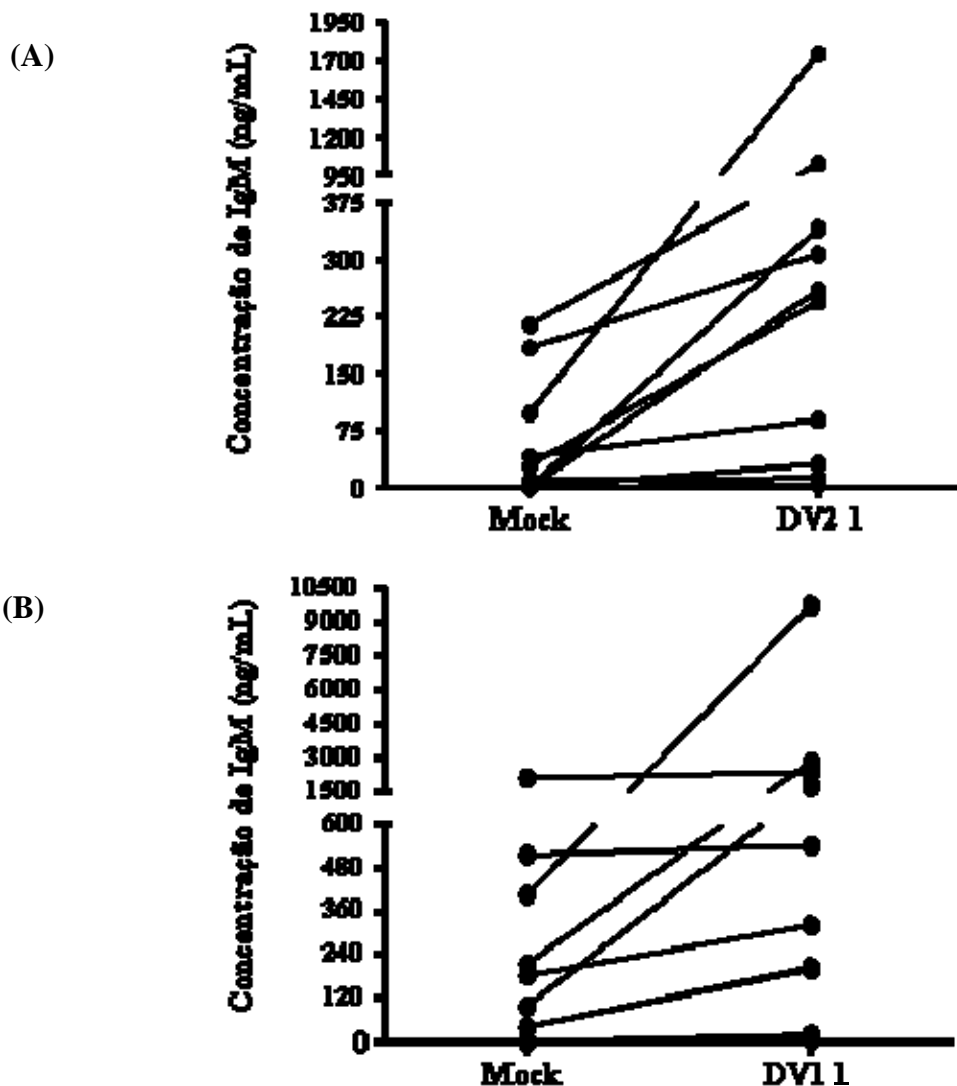


Figura 3: Análise da secreção de IgM por PBMC. PBMCs foram cultivadas com meio de cultura, sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock), com DV2 (MOI=1), ou com DV1 (MOI=1). As culturas foram mantidas por 15 dias a 37°C com atmosfera de 5%CO₂. Em seguida, os sobrenadantes foram recolhidos e foi feita a análise da secreção de IgM por ELISA de captura. Os círculos representam doadores individualmente e os traços servem para indicar os valores controles (com mock e, após infecção, com DV de cada indivíduo). Correlacionando os valores de Mock e DV, obtivemos em (A) P=0,0563 e em (B) P= 0,1501. Os resultados referentes ao Mock e DV foram subtraídos dos respectivos valores de Meio.

IV. 3) O vírus da dengue induz secreção de IgM diretamente por células B purificadas

Em seguida, foi avaliado se o vírus tem efeito direto sobre os linfócitos B. Para isso, cultivaram-se linfócitos B purificados na presença de DV2 e DV1 e foi medida a secreção de IgM nos sobrenadantes de cultura. Observou-se que ambos os sorotipos levaram a secreção de IgM, demonstrando um efeito direto dos vírus sobre células B (Figura 4). Como foi observado anteriormente que a taxa de infecção dessas células parece ser muito baixa, foi verificado se a infecção produtiva das mesmas seria necessária para que ocorresse ativação. Amostras de DV2 e DV1 foram inativadas por calor e os linfócitos B foram cultivados com os vírus nas suas formas nativa ou inativada para avaliação da produção de Ig. Como pode ser observado na figura 5 ambos os sorotipos induziram secreção de Ig mesmo quando inativados, sugerindo que não é necessária uma infecção viral produtiva para que seja induzida ativação celular.

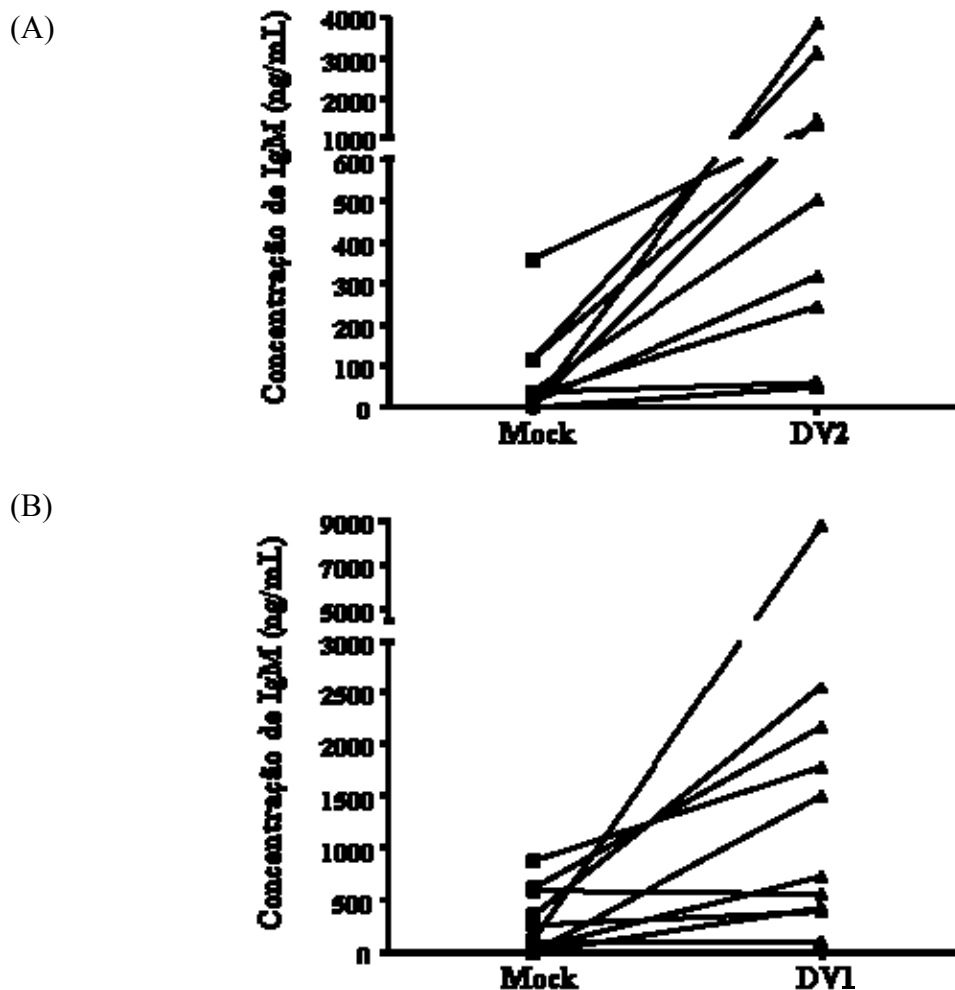


Figura 4: O vírus da dengue induz secreção de IgM diretamente por células B purificadas. Linfócitos B purificados foram cultivados com meio de cultura, sobrenadante de

células C6/36 não infectadas (Mock) e com DV1 (A) ou DV2 (B) (MOI=1). As culturas foram mantidas por 15 dias a 37°C com atmosfera de 5%CO₂. Em seguida, os sobrenadantes foram recolhidos e foi feita a análise da secreção de IgM por ELISA de captura. As retas representam o valor obtido em cada situação subtraindo-se o valor obtido em meio de cultura. As formas estão interligadas, pois representam cada doador individualmente. Os resultados obtidos foram subtraídos dos valores de Meio. (A) P = 0,0652; (B) P = 0,0096.

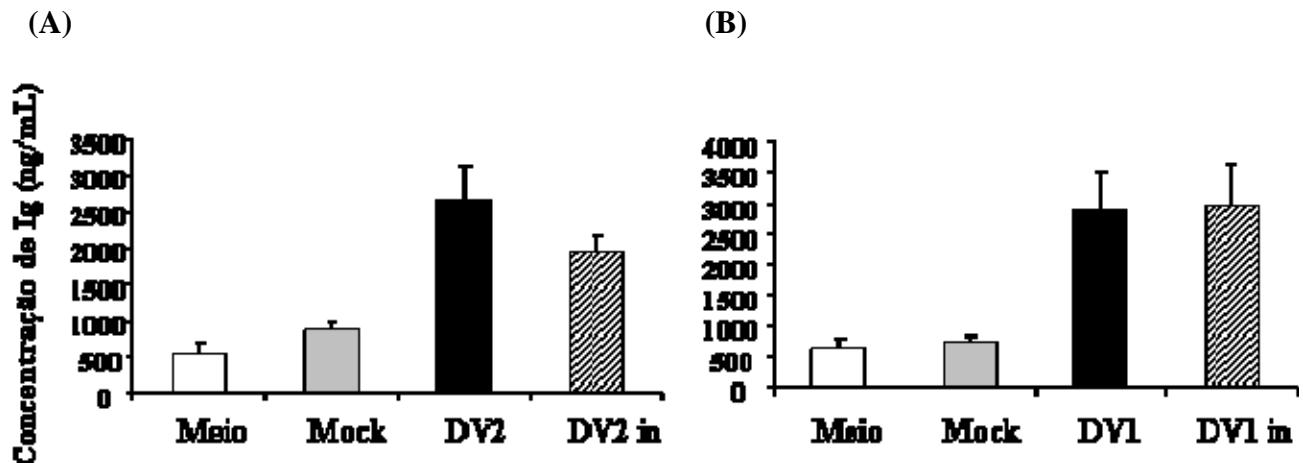


Figura 5: A infecção produtiva de linfócitos B não é necessária para indução da secreção de Ig pelo vírus da dengue. Linfócitos B purificados foram cultivados com DV2 (A), ou DV1 (B), nas suas formas nativa ou inativados por calor. Como controle, as células foram cultivadas com sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock), ou meio de cultura. Os linfócitos foram incubados por 15 dias a 37°C em atmosfera de 5%CO₂ e a concentração de IgM foi medida nos sobrenadantes de cultura por ELISA de captura. Foram realizados 8 experimentos com doadores distintos. O gráfico mostra a média destes experimentos.

IV. 4) O vírus da dengue induz o aumento da secreção de IL-6

Foi avaliado, também se o vírus da dengue seria capaz de levar a um aumento da secreção de IL-6 por linfócitos B purificados em diferentes tempos de cultura. Até o momento, um número limitado de experimentos foi realizado (2 experimentos). Os dados obtidos indicam que nas primeiras 24h de cultura não houve diferença na secreção de IL-6 entre os controles negativos e na presença do vírus da dengue. No entanto, foi observado que

após períodos de infecção de 48h, ao contrário dos controles negativos, o vírus da dengue foi capaz de induzir nível significativo de secreção de IL-6 (Figura 6).

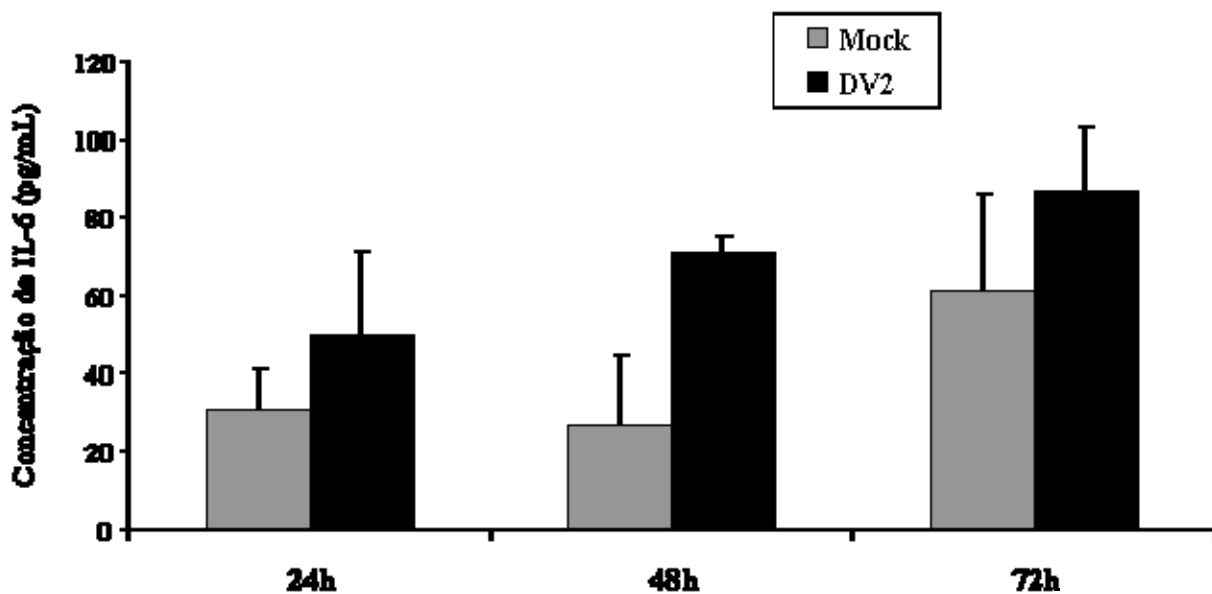


Figura 6: O vírus da dengue induz o aumento da secreção de IL-6. Linfócitos B purificados foram cultivados com meio de cultura, DV2, ou sobrenadantes de células C6/36 não infectadas (Mock), e incubados por 24h, 48h e 72h a 37^oC em atmosfera de 5%CO₂. Em seguida, a concentração de IL-6 nos sobrenadantes foi medida por ELISA. As barras representam os valores de Mock e DV2 após subtração dos valores obtidos nas culturas apenas com meio. Comparando-se os valores de Mock com DV2 nos tempos de 24h, 48h e 72h, temos respectivamente valores de P iguais a 0,1657; 0,0817 e 0,5342. Os valores apresentados correspondem a média de 2 experimentos.

IV. 5) Cultura de linfócitos B com DV induz fosforilação de MAPK

Nessa etapa do projeto foi iniciado um estudo dos mecanismos de sinalização intracelulares envolvidos na modulação da ativação das células B pelo vírus da dengue. Para isso, linhagem de célula B humana DAUDI foi cultivada com DV2 e, após 48h de cultura, as células foram lisadas e o padrão de fosforilação de proteínas envolvidas com ativação celular foi avaliado por western blotting. Primeiramente, foi avaliado o padrão de fosforilação de tirosinas totais através de marcação com anticorpo 4G10. Como visto na figura 7A, as células B, na presença de DV2 ou DV1, nas suas formas nativa ou inativada, não apresentaram diferença nesse padrão quando comparados com os controles negativos (meio e mock).

Entretanto, algumas diferenças foram observadas quando avaliamos a fosforilação de MAPK. A análise de fosforilação da MAPK ERK demonstrou um significativo aumento na expressão da forma fosforilada desta proteína (pERK) quando as células foram cultivadas com DV (Figura 7B). Esta diferença na fosforilação de ERK pode ser confirmada quando analisamos o mesmo evento em linfócitos B purificados na presença de DV2 (Figura 7C). Nós analisamos, ainda, a fosforilação da molécula p38, também pertencente à cascata de MAPK. Como pode ser visto na figura 7D, a cultura de células B com DV nas formas nativa ou inativada também induziu a fosforilação dessa MAPK. Esses dados sugerem que a ativação policlonal de linfócitos B humanos induzida pelo vírus da dengue pode estar relacionada a uma via de sinalização envolvendo as MAPK Erk e p38.

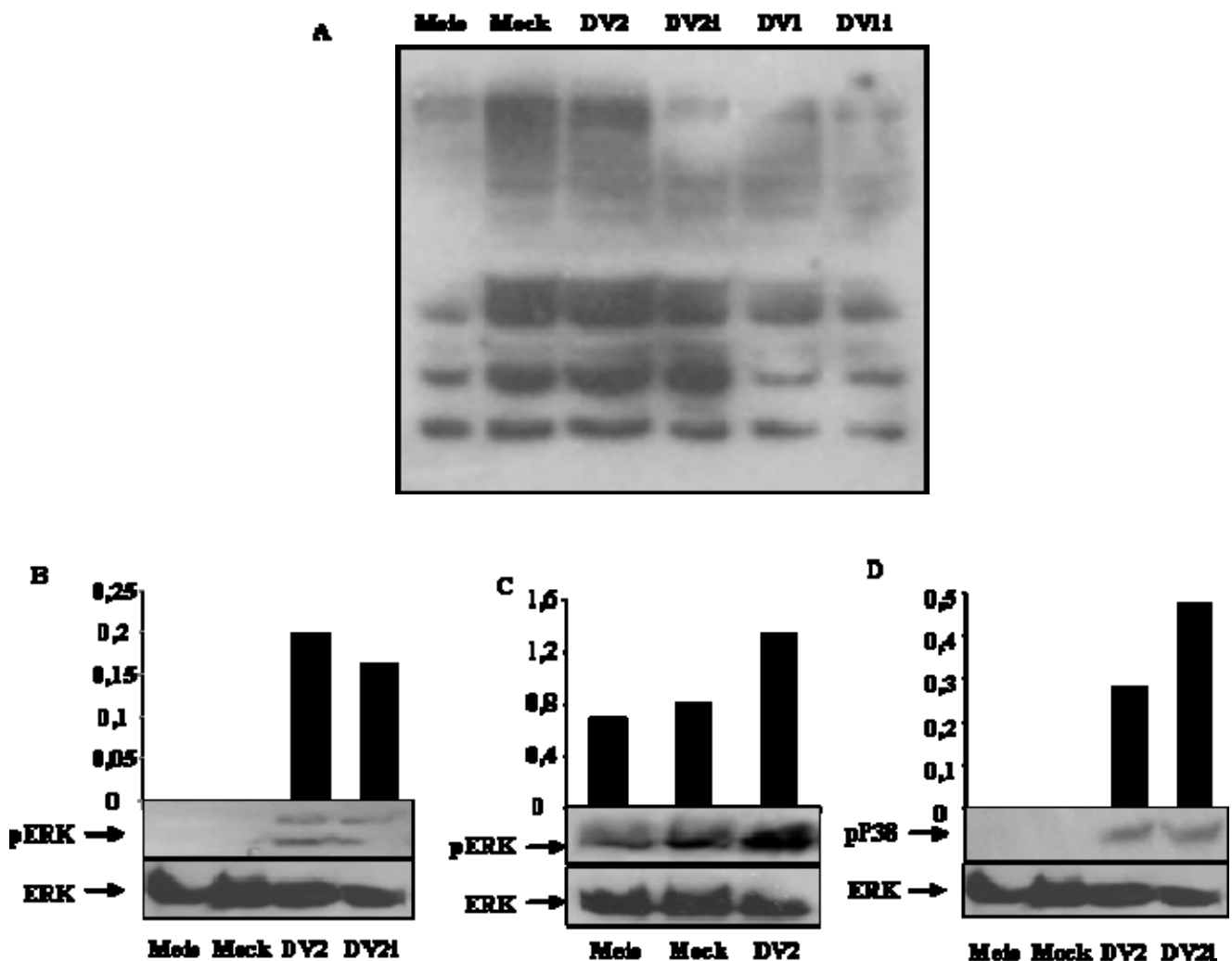
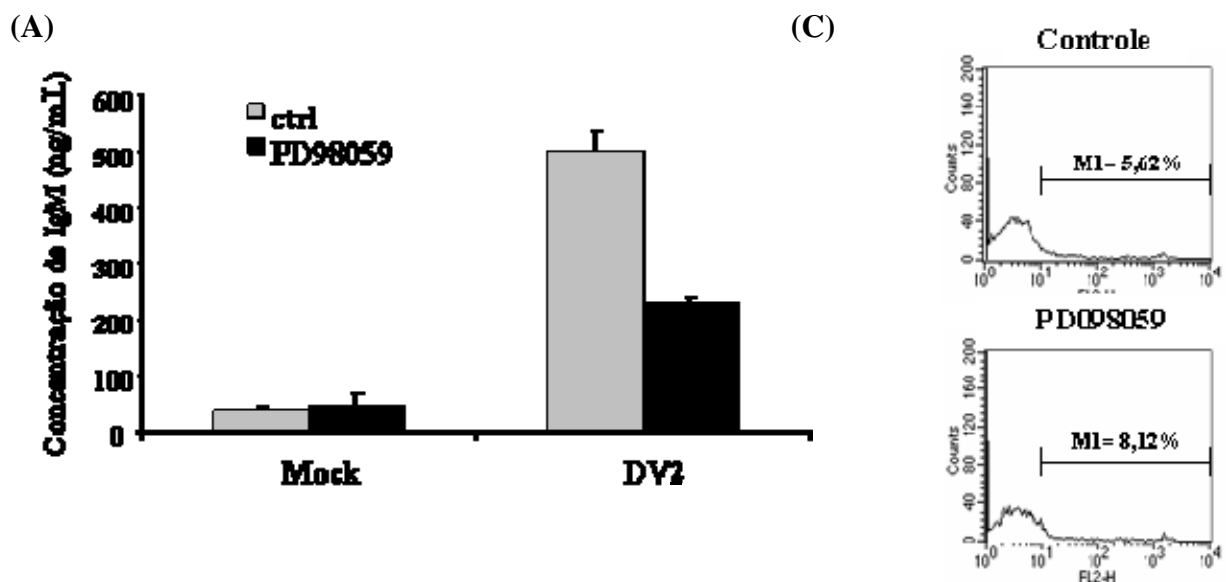


Figura 7: Análise da sinalização intracelular ativada pelo vírus da dengue. Células da linhagem DAUDI foram cultivadas com DV2 (MOI=1) e DV1 (MOI 0,1) nas formas nativa e inativada. Após 48h de cultura, as células foram lisadas e a análise do padrão de fosforilação

de proteínas foi realizada por western blotting após normalização da concentração de proteínas totais. (A) Avaliação do padrão de fosforilação total em resíduos de tirosina, através de marcação com anticorpo 4G10. (B, C) Análise da expressão de Erk e Erk fosforilada (pErk) em Daudi e linfócitos B respectivamente. (D) Análise da expressão de p38 fosforilada (pp38) em Daudi. Os gráficos em sobre os géis em (B), (C), e (D) demonstram a razão entre a concentração pERK e ERK total.

IV. 6) O bloqueio da ativação de Erk e p38 MAPK inibe a secreção de IgM mediada pelo DV

Como observado anteriormente nos experimentos de western blotting, o vírus da dengue induz um aumento de fosforilação das moléculas Erk e p38 em linfócitos B. Para verificar se tais vias de sinalização intracelular estariam relacionadas à indução da secreção de Ig pelo vírus da dengue, a ativação de ambas as moléculas foi inibida através da adição de seus inibidores específicos à cultura de linfócitos B infectados e foi feita dosagem de IgM após 15 dias de cultura. Como observado na figura 8, a adição dos inibidores das MAPK Erk (PD098059) (Figura 8A) e p38 (SB20358) (Figura 8B) aboliu a secreção de IgM induzida por DV. Paralelamente, foi feita uma análise da viabilidade dessas células cultivadas com os inibidores específicos através de marcação com iodeto de propídeo (PI) e não foi observada toxicidade nas concentrações das substâncias utilizadas (Figura 8C e 8D).



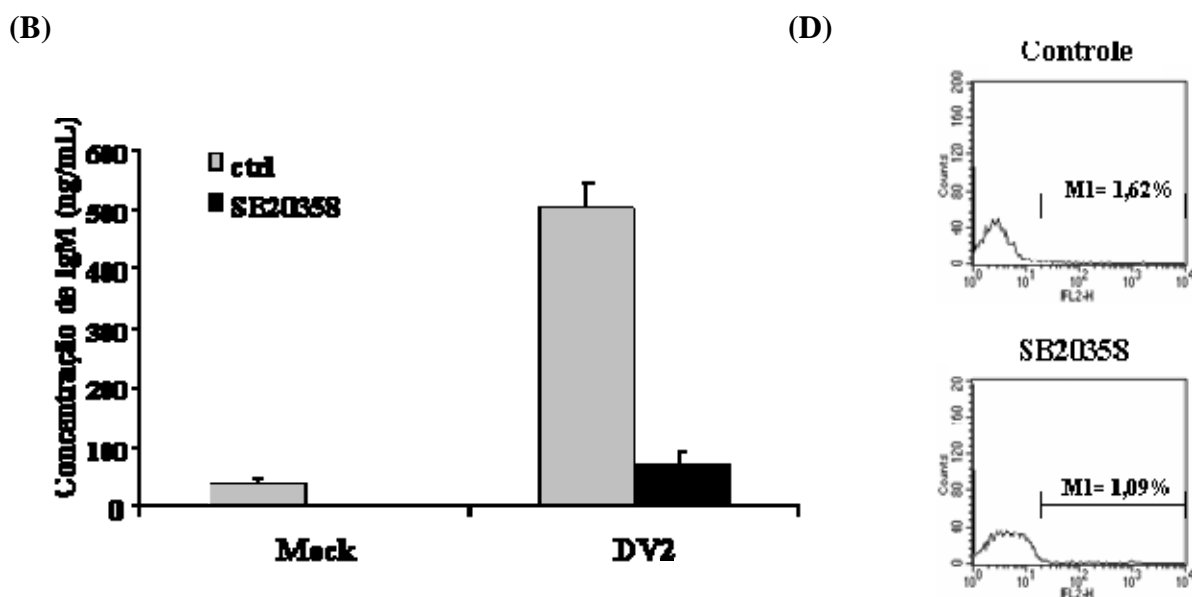


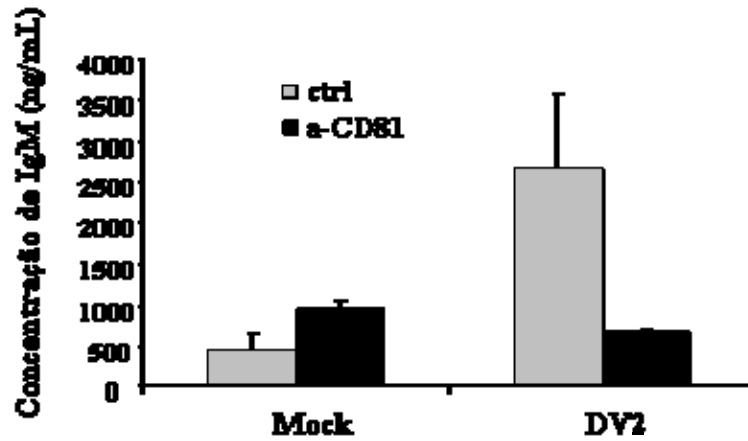
Figura 8: O bloqueio da ativação de Erk e p38 MAPK inibe a secreção de IgM mediada pelo DV. Linfócitos B purificados foram cultivados com DV2, sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock), ou meio de cultura, na presença ou ausência de inibidores de MAPK Erk (PD098059, 30µM) (A) e p38 (SB20358, 10µM) (B). Os linfócitos foram incubados por 15 dias a 37°C em atmosfera de 5%CO₂ e a concentração de IgM foi medida nos sobrenadantes de cultura por ELISA de captura. Os resultados demonstrados de Mock e DV2 foram obtidos após subtração dos valores obtidos em Meio de cultura. Em C e D estão mostrados os valores obtidos em células marcadas com iodeto de propídeo na presença dos inibidores de MAPK Erk e p38 respectivamente.

IV. 7) O bloqueio de CD81 inibe a secreção de IgM pelo DV

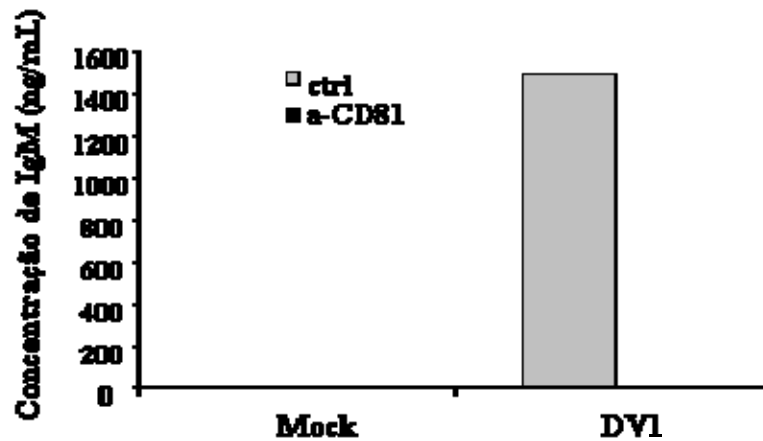
O próximo objetivo foi buscar que receptor poderia estar envolvido na ativação das células B pelo DV. Estudos anteriores demonstravam que a interação de proteína de envelope de HCV com CD81 induzia ativação de células B, de maneira independente de BCR e CD19 (Rosa, *et al.*, 2005). Dessa forma foi testado se essa molécula poderia estar também envolvida na interação das células B com o vírus da dengue. Para avaliar essa hipótese, foram adicionados em cultura de linfócitos B infectados anticorpos anti-CD81 e, após 15 dias, foi feita dosagem da secreção de IgM em cultura de 4 doadores distintos. Como observado na figura 9A e 9B, a adição de anticorpo anti-CD81 induziu uma menor secreção de IgM por linfócitos B na presença de ambos os sorotipos do vírus da dengue, sugerindo um papel

importante desse receptor na ativação celular mediada pelo DV. Paralelamente, foi feita uma análise da viabilidade dessas células cultivadas com o anticorpo anti-CD81 e este não apresentou toxicidade na concentração utilizada (Figura 9C).

(A)



(B)



(C)

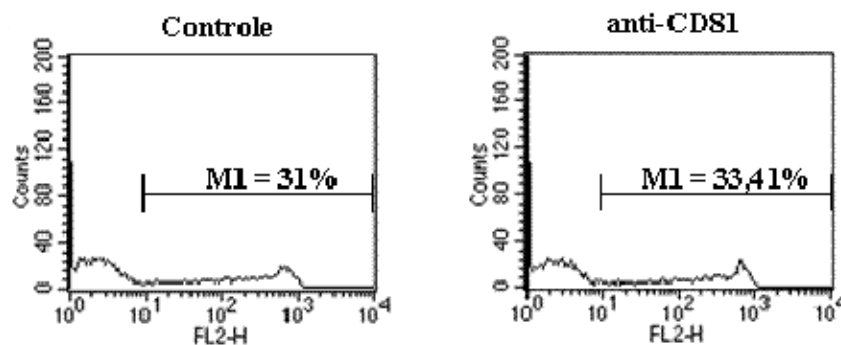
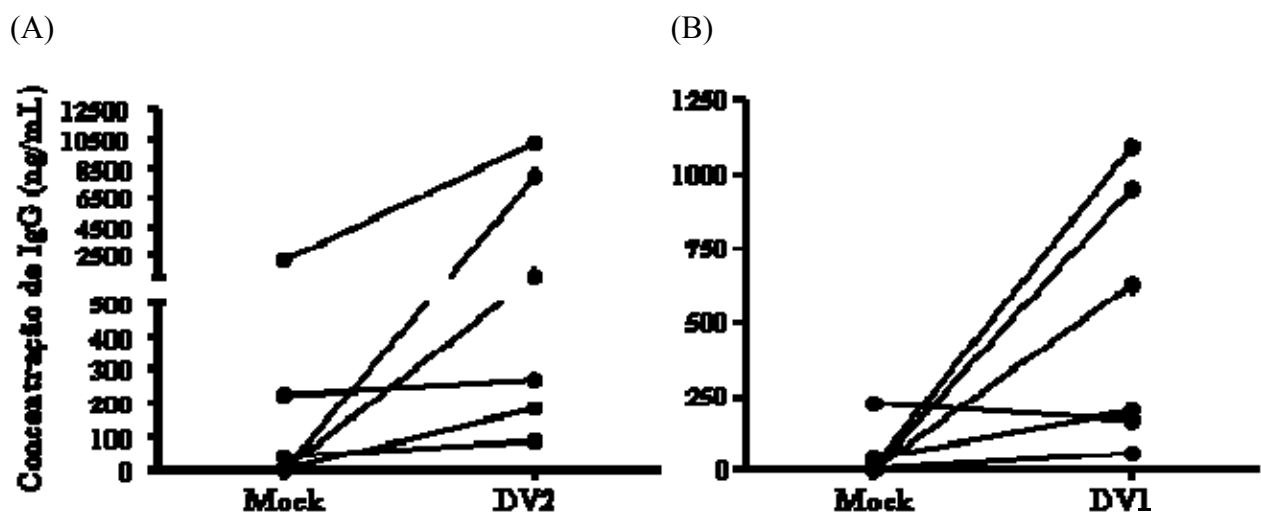


Figura 9: O bloqueio de CD81 inibe a secreção de IgM pelo DV. Linfócitos B purificados foram cultivados com DV2, DV1, sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock), ou meio de cultura, na presença ou ausência de anticorpo anti-CD81 (1 μ g/mL). Os linfócitos foram incubados por 15 dias a 37°C em atmosfera de 5%CO₂ e a concentração de IgM foi

medida nos sobrenadantes por ELISA de captura. Dados em (A) e (B) mostram os valores obtidos na presença de mock e após infecção com DV2 e DV1 respectivamente, subtraindo-se os valores de meio. Estes valores são representativos de um experimento.

IV. 8) O vírus da dengue induz secreção de IgG por PBMC, mas não por linfócitos B purificados

Os dados iniciais indicaram que o vírus da dengue induz o aumento no nível de secreção de IgM secretada em cultura de PBMC e de linfócitos B purificados. Foi avaliado, a seguir, se o vírus seria capaz de levar a uma mudança da classe de imunoglobulina secretada pelos linfócitos B. Para isso, foi medido o nível de IgG secretada em sobrenadantes de culturas de PBMC e de linfócitos B purificados cultivados com DV2 e com DV1. Os dados obtidos indicam que o DV2 (Figura 10A) e DV1 (Figura 10B) são capazes de induzir um aumento no nível de IgG em cultura de PBMC, mas não em cultura de linfócitos B purificados (Figura 10C e 10D). Tais dados sugerem que o vírus apresenta efeito direto sobre alguns mecanismos de ativação de linfócitos B, como por exemplo a secreção de IgM, mas que a mudança de classe de Ig depende da presença de outros tipos celulares ou de fatores secretados presentes nas culturas de PBMC.



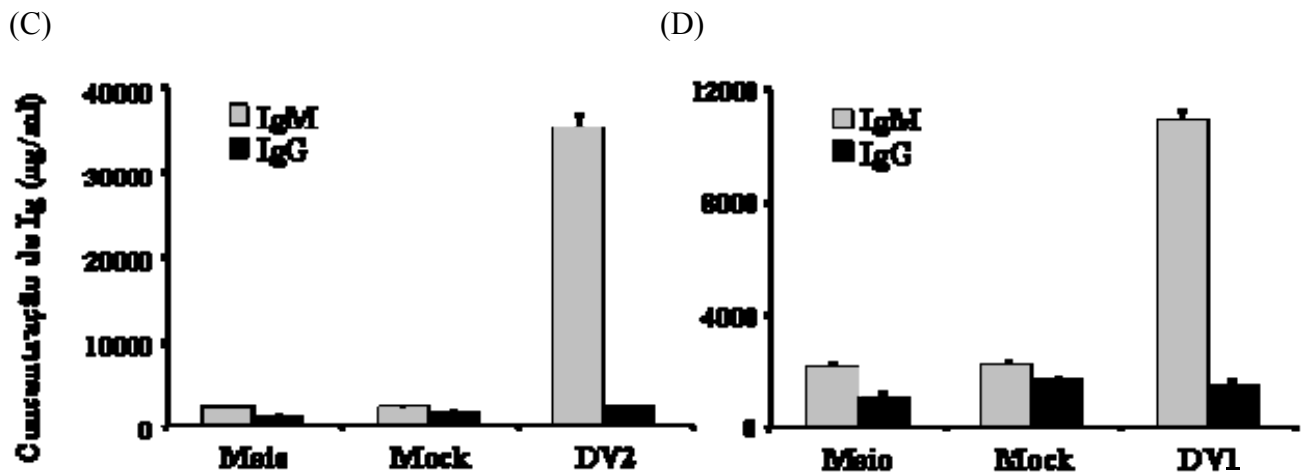


Figura 10: O Vírus da dengue não induz aumento de IgG em linfócitos B purificados. PBMC (A e B) e linfócitos B purificados (C e D) foram cultivados com DV2 ou DV1 (MOI=1). Como controle, as células foram cultivadas com sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock), ou meio de cultura. As culturas foram incubadas por 15 dias a 37°C em atmosfera de 5%CO₂ e a concentração de Ig foi medida nos sobrenadantes por ELISA de captura. Em A e B, os valores apresentados para Mock e DV foram obtidos após subtração dos valores obtidos nas culturas apenas com meio de cultura. (A) P= 0,1771; (B) P=0,0214.

IV. 9) Sobrenadante de monócitos infectados por DV induz mudança de classe de Ig

Diante dos resultados descritos, foi avaliado se a secreção de IgG poderia ser modulada por componentes solúveis secretados por outros tipos celulares cultivados com o vírus. Foram utilizados inicialmente monócitos primários, que são uma das principais células alvo do vírus da dengue, além de secretarem citocinas capazes de modular a resposta de células B, quando cultivados com o vírus (Lin *et al*, 2002a). Tais células foram cultivadas com DV1 ou sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock) e, após 48h, os sobrenadantes dessas culturas foram recolhidos e utilizados como estímulo para linfócitos B isolados do mesmo doador. Em paralelo, as células foram também cultivadas com o vírus ou mock, nas mesmas condições descritas previamente. A figura 11A confirma, mais uma vez, que a cultura de linfócitos B purificados com DV1 não apresenta aumento da secreção de IgG. Entretanto, quando as células foram cultivadas com sobrenadantes de monócitos infectados, juntamente com o vírus, o aumento da produção de IgG foi bastante significativo (Figura 11B).

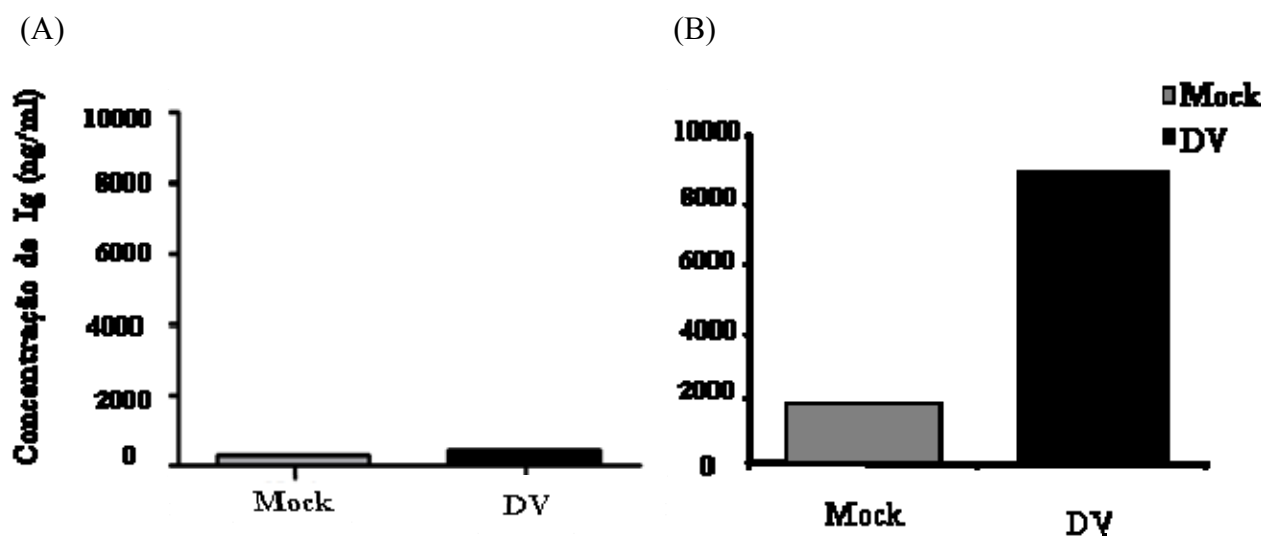


Figura 11: Sobrenadante de monócitos infectados por DV induz mudança de classe de Ig. Monócitos foram incubados na presença de DV1 ou sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock) e os sobrenadantes das culturas foram recolhidos após 48hs. Em seguida, linfócitos B purificados do mesmo doador foram incubados na presença desses sobrenadantes, de DV1 isolado, ou de sobrenadante de células C6/36 não infectadas. Após 15 dias, os sobrenadantes de cultura foram recolhidos e foi feita a dosagem de IgG por ELISA de captura. Em (A) está representada a concentração de IgG obtida nas culturas de linfócitos B com vírus ou mock. Em (B), a concentração de IgG obtida nas culturas de linfócitos B cultivados com sobrenadante de monócitos (previamente cultivados com vírus ou mock).

IV. 10) Adição de IL-6 exógena induz aumento da secreção de IgG pelo DV

Por fim, foi analisado o papel de citocinas possivelmente secretadas por monócitos infectados na indução da secreção de IgG por células B purificadas. Inicialmente, foi avaliado se a adição de IL-6 exógena a cultura de células B purificadas com DV2 poderia modular a secreção de IgG. Como pode ser visto na figura 12, a IL-6 foi capaz de induzir um aumento significativo na secreção de IgG por linfócitos B na presença do vírus, indicando que esse pode ser um dos fatores envolvidos com a modulação da ativação dessas células nas culturas de PBMC.

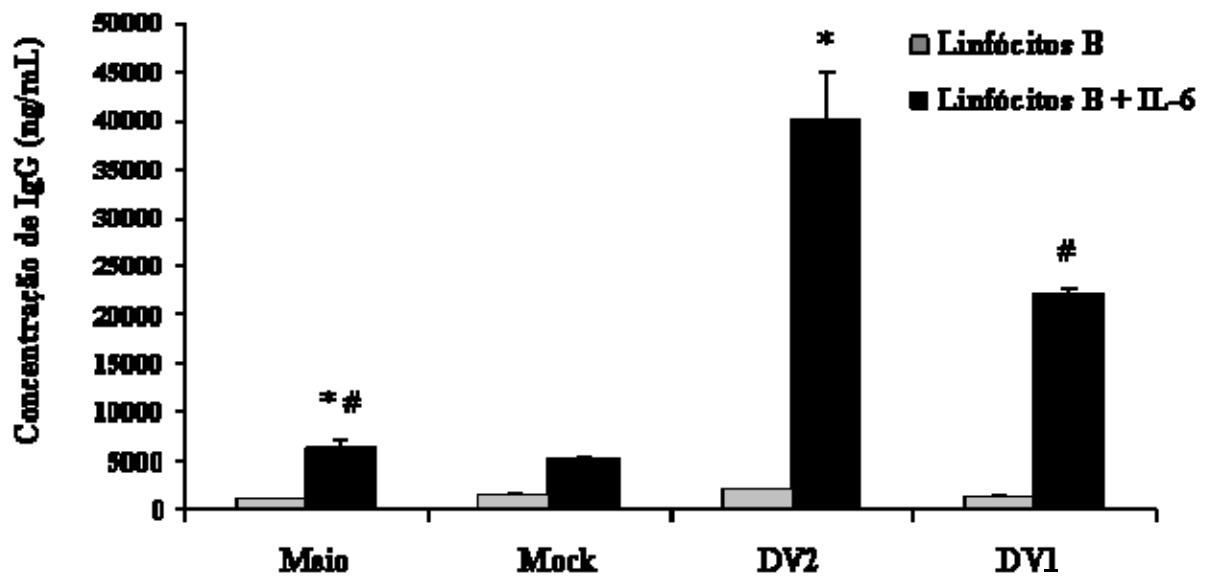


Figura 12: Adição de IL-6 exógena induz aumento da secreção de IgG pelo DV. Linfócitos B purificados foram cultivados com DV2, DV1, sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock), ou meio de cultura, na presença ou ausência de IL-6. As culturas foram incubadas por 15 dias a 37⁰C em atmosfera de 5%CO₂ e a concentração de IgG foi medida nos sobrenadantes por ELISA de captura. Os símbolos representam os valores de P: *# P= 0,05 (comparando-se meio com DV2 e meio com DV1 respectivamente). O resultado apresentado corresponde a um experimento representativo.

V) DISCUSSÃO

A ativação de linfócitos B e a conseqüente produção de anticorpos é uma das estratégias do sistema imune para o controle de uma infecção viral. A função efetora dos anticorpos está associada à neutralização da partícula viral e à inibição de sua entrada nas células hospedeiras; a opsonização dos vírus, com ativação do sistema complemento; e a apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T (Mandel, 1976; Cooper & Nemerow, 1984). Durante a infecção pelo vírus da dengue é detectada a secreção de IgM específica logo no início da infecção, por volta do 4º dia. Esta resposta é seguida da secreção de IgG. Diversos estudos mostram que a infecção induz imunidade protetora sorotipo-específica. Esse achado é corroborado por estudos que demonstram, em modelos experimentais de vacinação, que a indução de anticorpos neutralizantes está diretamente associada à proteção contra a infecção viral (Rothmand & Ennis, 1999; Endy *et al.*, 2004).

Por outro lado, a desregulação da resposta imune pode estar associada a uma exacerbação da resposta inflamatória, a qual pode contribuir para a patogênese de uma infecção viral (Lei *et al.*, 2001). A infecção pelo vírus da dengue pode induzir um espectro de manifestações clínicas que variam desde a febre clássica da dengue, caracterizada por sintomas de febre, mialgia e prostração, até o desenvolvimento de manifestações graves de febre hemorrágica e síndrome do choque. Essas estão associadas a alterações na coagulação sanguínea e extravasamento de plasma, podendo até mesmo levar ao óbito. A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos de dengue pode induzir essas manifestações clínicas e os mecanismos que induzem a progressão para formas severas da doença não são totalmente compreendidos (Figueiredo & Fonseca; 2004).

Uma das primeiras hipóteses existentes para explicar o surgimento de formas graves diz respeito a potencialização da infecção mediada por anticorpos. Essa hipótese foi proposta principalmente, a partir de observações epidemiológicas de que infecções secundárias heterotípicas estavam associadas a uma maior probabilidade de desenvolvimento de dengue hemorrágica (Halstead & O'Rourke, 1977). Recentemente, foi relatado que a interação do vírus com anticorpos sub-neutralizantes e posterior infecção de células mononucleares está associada não só a um aumento da produção de vírus por essas células, mas também a uma alteração no padrão de ativação celular (Chareonsirisuthigul, Kalayanaroj & Ubol, 2007). Apesar destes achados que sugerem a existência do fenômeno de “enhancement”, o seu mecanismo ainda é pouco compreendido.

Muito se estuda a respeito da infecção de monócitos e macrófagos pelo vírus. No entanto, recentemente foi observado que além destas células, linfócitos B também seriam células alvos de infecção, sendo capazes de suportar a replicação viral (Lin *et al.*, 2002a). A ativação dos linfócitos B e produção de anticorpos representa um componente importante da patogênese da dengue, não só devido ao “enhancement”, mas também devido à presença de autoanticorpos que foram observados durante a infecção e em modelos experimentais (Lin *et al.*, 2001; Falconar, 1997). Essas células, quando ativadas, podem secretar, ainda, algumas das citocinas comumente associadas a formas graves da doença, como IL-6 e TNF- α (Lin *et al.*, 2002a; Lei *et al.*, 2001). Entretanto, salvo um único estudo que avalia a infecção e secreção de citocinas mediada pelo vírus isolado ou complexado a anticorpos em concentrações sub-neutralizantes, os efeitos do vírus sobre mecanismos celulares de ativação de células B, ainda não foi investigado.

A partir desta idéia, o presente projeto objetivou um estudo mais detalhado da interação do vírus com esse tipo celular, desde a infecção até um possível mecanismo de sinalização intracelular envolvido na ativação de linfócitos B. Primeiramente foi observado que tanto linfócitos B presentes em PBMC quanto purificados e linhagem de linfócitos B eram susceptíveis a infecção pelo sorotipo 2 do vírus da dengue. No entanto, quando foram analisadas as partículas virais liberadas no sobrenadante dessas culturas infectadas, pudemos observar que estas não eram infecciosas ou apresentavam baixa taxa de infecciosidade. Uma análise futura com MOIs ainda mais elevados e avaliação morfológica das partículas liberadas por essas células pode esclarecer melhor a questão da permissividade dos linfócitos B a infecção. Isso será importante uma vez que há uma controvérsia sobre a infecção de linfócitos B pelo vírus da dengue. Lin e colaboradores observaram que linfócitos B, na presença de um alto MOI de vírus (MOI=10) são infectados e suportam ativamente a replicação viral. Além disso, linfócitos B apresentam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias secretadas, comparáveis aos níveis observados por monócitos infectados. No entanto, outros autores relataram, recentemente, que linfócitos B, mesmo na presença de um MOI de 20 não são infectados pelo vírus e que somente macrófagos e monócitos se apresentam suscetíveis à infecção (Blakeley *et al.*, 2007; Kou *et al.*, 2008).

Uma vez demonstrada a infecção de linfócitos B pelo vírus da dengue, foi avaliado o efeito dessa interação com o vírus sobre a ativação destas células através da análise de secreção de imunoglobulinas. Sabe-se que linfócitos secretam imunoglobulinas quando ativados, por exemplo, no caso de uma infecção viral. Linfócitos B provenientes de uma população PBMC e linfócitos B purificados, na presença do vírus da dengue, apresentaram

taxas maiores na secreção de IgM em comparação com linfócitos não infectados. Esses dados sugerem que o DV induza ativação policlonal dessas células. Uma questão importante é se os doadores avaliados já haviam tido contato prévio com o DV, o que poderia levar a uma produção aumentada de Ig específicas e não necessariamente ativação policlonal. Para verificar essa hipótese, o plasma dos doadores foi avaliado quanto a presença de IgG anti-dengue. Dentre os doadores testados até o momento, apenas um apresentou sorologia negativa, o que nos impede de concluir definitivamente que se trata de ativação policlonal. Entretanto, esse doador soronegativo apresentou um aumento significativo da secreção de Ig. Além disso, 8 doadores que apresentam uma sorologia confirmada para a dengue falham na secreção de Igs em um novo contato com o vírus *in vitro*. Um aumento do número de indivíduos analisados e uma análise da especificidade dos anticorpos secretados poderia esclarecer melhor a hipótese de ativação policlonal e são experimentos que estão em andamento.

Apesar das baixas taxas de infecção detectadas, foi visto que o nível de secreção de imunoglobulinas apresentava-se muito aumentado. Uma explicação para este achado seria de que apenas a interação do vírus com receptores presentes na membrana dos linfócitos B levasse a ativação destas células. Para avaliar essa hipótese, linfócitos B foram incubados tanto com o vírus na forma nativa quanto inativada e foi avaliado o nível de imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos. Como resultado, observou-se que mesmo na forma inativada, o vírus da dengue era capaz de induzir aumento da secreção de IgM. Este achado sugere que não haveria necessidade de uma infecção produtiva para que o linfócito B fosse ativado e começasse a secretar IgM, somente o contato entre a membrana da célula e o envelope viral seria capaz de ativar o linfócito. A ativação de linfócitos B por componentes virais, independente de infecção produtiva, já foi observada em outros modelos. Um dos principais modelos de estudo de infecção viral em linfócitos B, o EBV (Epstein-Barr vírus), apresenta proteínas no seu envelope capazes de se ligar à molécula de CD81 presente na superfície do linfócito B e induzir secreção de TNF- α (Altomonte *et al.*, 1996). Nos experimentos mostrados neste trabalho foi realizada a inativação do vírus por calor. Apesar de ter sido detectada ativação de linfócitos B, esse procedimento pode alterar a conformação de proteínas do envelope, levando a uma alteração nos mecanismos de interação com a célula B. Futuramente, serão realizados ensaios de adesão entre o vírus nas suas formas nativa e inativada com as células B. Além disso, experimentos utilizando proteína E recombinante em vez de partículas virais podem contribuir para verificar a hipótese de que apenas a adsorção do vírus a receptores de superfície seria capaz de induzir a ativação de linfócitos B.

Após verificação da capacidade de secreção de imunoglobulinas pelo linfócito B, após infecção com DV, foi realizada a análise do mecanismo de ativação induzidos pelo vírus da dengue. Além do EBV, o HCV, pertencente à família *Flaviviridae*, assim como o DV, infecta e é capaz de estimular diferentes mecanismos de ativação de linfócitos B. A infecção por esse vírus está associada a desordens proliferativas de linfócitos B, que incluem crioglobulinemia e desenvolvimento de linfoma B (Silvestri *et al.*, 1996). Recentemente demonstrou-se que CD81 está envolvido no processo de entrada e infecção de células humanas por HCV gerados *in vitro* (Lindenbach *et al.*, 2005). Foi demonstrado, ainda, que o engajamento multimérico de CD81 é capaz de induzir proliferação de linfócitos B e aumento na expressão de alguns marcadores de ativação na ausência de citocinas exógenas e ligação ao BCR, e que epitopos envolvidos na ligação do HCV às células alvos são necessários para que este processo ocorra (Rosa *et al.*, 2005). O fenótipo de ativação observado pela ligação da proteína E2 ao CD81 é também observado em células obtidas de paciente, e a expressão desses marcadores de ativação é reduzida após o tratamento destes pacientes (Rosa *et al.*, 2005). Esses achados sugerem que a interação do HCV com os linfócitos B induz ativação dessas células, por uma via dependente da ligação ao CD81. Além disso, foi observado que a ligação ao CD81 induzia ativação da cascata de MAPK Jnk, através da acumulação da forma ativa de c-jun, e que a ativação das células B era diminuída quando um inibidor específico de c-jun era adicionado a cultura (Rosa *et al.*, 2005).

Outros trabalhos demonstraram que o engajamento de CD81 por E2 purificada induz hipermutação do gene de Ig e produção de TNF- α (Machida *et al.*, 2005). Isso sugere que o HCV é capaz de induzir ativação independente do receptor de antígenos do linfócito B via ligação ao CD81. Em linfócitos T, a ligação de E2 induz, ainda, a ativação das MAPK ERK e p38, o que está relacionado à proliferação e produção de citocinas por essas células (Zhao *et al.*, 2006). A ativação de ERK pela proteína E2 foi também observada em hepatócitos e a habilidade de ativar a cascata de MAPK diretamente e prolongar a atividade em resposta a estímulos mitógenos pode contribuir para a transformação neoplásica em hepatócitos infectados pelo HCV (Panteva, Korkaya & Jameel, 2003).

Baseados nestes dados da literatura foram avaliados, neste trabalho, os mecanismos de sinalização intracelular envolvidos na ativação de linfócito B pelo vírus da dengue e um possível receptor envolvido nesse processo. Primeiramente, foi investigado o padrão de fosforilação proteínas em resíduos de tirosina e foi observado que o vírus da dengue não induzia diferenças significativas em comparação com os controles negativos. A partir daí, foram avaliados outros possíveis mecanismos de ativação envolvidos. Para isso, foi utilizada

linhagem de linfoma B DAUDI na presença de vírus nativo e inativado e o padrão de fosforilação de diferentes MAPK foi avaliado. Pôde-se observar que o vírus da dengue, sorotipo 2, tanto na forma nativa quanto inativada, era capaz de induzir um aumento na fosforilação das moléculas ERK e p38. Para avaliar o papel da ativação dessas MAPK no aumento da secreção de Ig induzido pelo DV, foram utilizados os inibidores das moléculas ERK e p38, em seguida, foi feita a dosagem de imunoglobulinas secretadas pelas culturas tratadas. Os dados obtidos mostram que na presença dos inibidores de proteínas MAPK, a secreção de IgM por linfócitos B purificados era diminuída. Estes resultados demonstram que as cascatas de Erk e p38 estão envolvidas na ativação de linfócitos B induzida pelo vírus.

O próximo passo foi, então, caracterizar um receptor envolvido no processo de ativação das células B. Como descrito anteriormente, a molécula CD81 participa da ativação de células B por HCV. Uma vez que o HCV e o vírus da dengue são da mesma família, apresentam similaridade estrutural, e ambos induzem ativação de células B, esse receptor nos pareceu um candidato promissor. Foi observado que, quando feito o bloqueio da molécula de CD81, a secreção de IgM por linfócitos B purificados induzida pelo vírus era diminuída. Tal dado sugere que CD81 apresenta um papel importante na ativação de linfócitos B pelo vírus da dengue. No entanto, outros estudos seriam necessários para melhor caracterizar o papel desta molécula, como por exemplo, ensaios de colocalização por microscopia confocal e coimunoprecipitação.

Até então, nosso estudo focou na ativação de linfócitos B e sua conseqüente secreção de IgM induzida pelo vírus da dengue. No entanto, além de IgM, IgG também pode ser detectada em uma infecção viral. Assim, foi avaliada também, se o DV seria capaz de induzir mudança de classe de imunoglobulina. Linfócitos B presentes na população PBMC, na presença do vírus, apresentavam um alto nível de secreção de IgG. No entanto, foi visto que linfócitos purificados não apresentavam taxas significativamente maiores de IgG, como foi observado em PBMC. Isso sugeriu que fatores presentes na população PBMC eram capazes de induzir a mudança de isotipo da imunoglobulina. Sabe-se que monócitos aderentes são descritos como a principal célula alvo em uma infecção pelo DV (Scott *et al.*, 1980). Com isso, uma hipótese para explicar a ausência de produção de IgG em culturas de linfócitos B purificados seria a de que monócitos infectados poderiam estar indiretamente ativando linfócitos B. Para avaliar essa hipótese, foi realizada uma cultura de linfócitos B purificados com sobrenadantes de monócitos infectados e foi avaliada a taxa de secreção de IgG. Foi demonstrado que sobrenadantes de monócitos infectados eram capazes de induzir um aumento no nível de IgG secretada por linfócitos B purificados, no entanto, ainda não foi

caracterizado o mecanismo pelo qual estes monócitos induzem esse aumento de secreção desta imunoglobulina.

Monócitos infectados pelo vírus da dengue secretam IL-1, TNF- α , e IL-6 (Chen & Wang, 2002; Lin *et al.*, 2002a). Dentre as citocinas pró-inflamatórias, a IL-6 é largamente conhecida por participar da ativação de linfócitos B, promovendo a diferenciação destes linfócitos em células plasmáticas maduras capazes de secretar imunoglobulinas (Hirano T, 1994). Tal citocina é capaz de modular a secreção de IgM e IgG mediada por BCR e CD40 (Burdin *et al.*, 1995). Além disso, em um modelo de co-cultura *in vitro*, foi descrito que monócitos são capazes de suportar a diferenciação de linfócitos B de forma independente de células T e esse efeito parece ser mediado, principalmente, pela IL-6 (Shiba *et al.*, 1990). Vale ressaltar, que TNF- α e IL-1, também produzidas por monócitos infectados por DV, também já foram associadas à modulação da secreção de Ig. Entretanto, o efeito dessas citocinas parece ser indireto, através de regulação autócrina da produção de IL-6 por monócitos (Roldan *et al.*, 1992). Desse modo, um mediador que possivelmente estaria envolvido em uma secreção de IgG no nosso modelo de estudo seria a IL-6. Para testar esta hipótese, foi adicionada IL-6 exógena em cultura de linfócitos B purificados infectados e foi observado um aumento no nível de IgG secretada. Isso nos leva a crer que essa citocina pode ser um dos mediadores presentes nos sobrenadantes de monócitos infectados envolvidos com aumento da secreção de IgG. Para confirmar essa hipótese, experimentos realizando o bloqueio dessa citocina serão necessários. É possível também que mediadores secretados por linfócitos T ou ainda, que o contato entre células B e linfócitos T e/ou monócitos contribua para a secreção de IgG observada nas culturas de PBMC. Experimentos de cocultura entre diferentes tipos celulares e análise do perfil de citocinas secretados pelos mesmos serão necessários para elucidar esses mecanismos.

Em resumo, na presente dissertação, demonstramos que linfócitos B, apesar de apresentarem uma baixa taxa de infecção e de serem ineficientes na secreção de novas partículas infecciosas, são altamente ativados na presença do DV. Esta ativação é independente de infecção produtiva e pode ser induzida por diferentes sorotipos virais. O receptor CD81 parece ser uma das moléculas envolvidas na interação com o vírus e essa interação parece resultar na ativação das MAPK Erk e p38, levando ao aumento da secreção de Ig. Essa secreção de Ig aumentada poderia vir a ter papel importante como um mecanismo de indução da patogênese viral contribuindo no desenvolvimento das formas graves da doença. Dados na literatura sugerem que anticorpos heterólogos secretados em níveis não-neutralizantes durante uma infecção secundária são capazes de induzir uma potencialização

desta infecção. Além disso, já foi descrita a presença de autoanticorpos, como, por exemplo, anticorpos anti-plaquetas e anti-células endoteliais, importantes nesse agravamento da doença. Estes achados sugerem que linfócitos B podem ter um papel importante na patogênese da dengue e estudos que investigam a resposta desta célula ao DV, como o presente projeto, podem levar ao esclarecimento do real papel de linfócitos B na patogênese da infecção.

V) REFERÊNCIAS:

- ACOSTA E. G, CASTILLA V. & DAMONTE E.B. 2008. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol.*, 89: 474–484.
- ALTOMONTE M., MONTAGNER R., PUCILLO C. & MAIO M. 1996. Triggering of target of an antiproliferative antibody-1 (TAPA-1/CD81) up-regulates the release of tumour necrosis factor-alpha by the EBV-B lymphoblastoid cell line JY. *Scand. J. Immunol.*; 43: 367–373.
- AVIRUTNAN P., MALASIT P., SELIGER B., BHAKDI S. & HUSMANN M. 1998. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J. Immunol.*; 161: 6338-6346.
- AVIRUTNAN P., ZHANG L., PUNYADEE N., MANUYAKORN A., PUTTIKHUNT C., KASINRERK W., MALASIT P., ATKINSON J. P. & DIAMOND M. S. 2007. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. *PLoS Pathog.*, 3 (11): 1798-1812.
- 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. 1998. Pathophysiological and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J. Inf. Dis.*, 177: 778-782.
- BLACKLEY S., KOU Z., CHEN H., QUINN M., ROSE R. C., SCHLESINGER J. J., COPPAGE M. & JIN X. 2007. Primary human splenic macrophages, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus infection in vitro. *J. Virol.*; 81(24): 13325–13334.
- BOONNAK K., SLIKE B. M., BURGESS T. H., MASON R. M., WU S. J., SUN P., PORTER K., RUDIMAN I. F., YUWONO D., PUTHAVATHANA P. & MAROVICH M. A. 2008. Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol.*; 82 (8): 3939-3951.

BOONPUCKNAVIG S., BHAMARAPRAVATI N., NIMMANNITYA S., PHALAVADHTANA A. & SIRIPONT J. 1976. Immunofluorescent staining of the surfaces of lymphocytes in suspension from patients with dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Pathol.*; 85: 37–48.

BORISH L. C. & STEINKE J. W. 2003. Cytokines and chemokines. *J. Allergy. Clin. Immunol.*; 111: 460-475.

BROWN M. G., HUANG Y. Y., MARSHALL J. S., KING C. A., HOSKIN D. W. & ANDERSON R. 2009. Dramatic caspase-dependent apoptosis in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells. *J. Leukoc. Biol.*; 85: 71-80.

BURDIN N., KOOTEN C. V., GALIBERT L., ABRAMS J. S., WIJDENES J., BANCHEREAU J. & ROUSSET F. 1995. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J. Immunol.*, 154: 2533-2544.

CARLONI V., MAZZOCCA A. & RAVICHANDRAN, K. S. 2004. Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signaling by Shc in liver tumor cells. *Oncogene*, 23: 1566–1574.

CHANG S., DOLGANIUC A. & SZABO G. 2007. Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J. Leukoc. Biol.*; 82: 479–487.

CHAREONSIRISUTHIGUL T., KALAYANAROOJ S. & UBOL S. 2007. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J. Gen. Virol.*; 88: 365–375.

CHARRIN S., LE NAOUR F., LABAS V., BILLARD M., LECAER J. P., EMILE J. F., PETIT M. A., BOUCHEIX C. & RUBINSTEIN E. 2003. EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem. J.*; 373: 409–421.

CHATURVEDI U. C., RAGHUPATHY R., PACSA A. S., ELBISHBISHI E. A., AGARWAL R., NAGAR R., MISRA A., KAPOOR S., MATHUR A., KHAN M. A. Y. &

AZIZIEH F. 1999. Shift from a Th1-type response to Th2-type in dengue haemorrhagic fever. *Curr. Sci.*; 76: 63-69.

CHEN Y. C., WANG S. Y. & KING C. C. 1999. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14- dependent mechanism. *J. Virol.*; 73: 2650–2657.

CHEN Y. C. & WANG S. Y. 2002. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J. Virol.*; 76 (19): 9877–9887.

CHEN Y., T. MAGUIRE R. E. HILEMAN J. R. FROMM J. D. ESKO R. J. LINHARDT & R. M. MARKS. 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* 3: 866–871.

CLYDE K., KYLE J. L. & HARRIS E., 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.*; 80 (23): 11418-11431.

COLOGNA R. & RICO-HESSE R. 2003. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J. Virol.*; 77: 3929-3938.

COOPER N. R. & NEMEROW G. R. 1984. The role of antibody and complement in the control of viral infections. *J. Invest. Dermatol.*; 83: 121-127.

DAVIS R. J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*; 103: 239-252.

DE KRUIF M. D., SETIATI T. E., MAIRUHU A. T. A., KORAKA P., ABERSON H. A., SPEK C. A., OSTERHAUS A. D. M. E., REITSMA P. H., BRANDJES D. P. M., SOEMANTRI A. & VAN GORP E. C. M. 2008. Differential gene expression changes in children with severe dengue virus infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2(4): 1-9.

DEGALLIER N., TEIXEIRA J. M. S., SOARES S. S., PEREIRA R. D., PINTO S. C. F., CHAI A. J. M., VASCONCELOS P. F. C. & OLIVEIRA E. 2003. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. *Rev. Saúde Pública*; 37 (3): 386-387.

DEUBEL V., KINNEY R. M. & TRENT D. W. 1988. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology*, 165 (1): 234-244.

ENDY T. P, NISALAK A., CHUNSUTTITWAT S., VAUGHN D. W., GREEN S., ENNIS F. A., ROTHMAN A. L. & LIBRATY D. H. 2004. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J. Infect Dis.*; 189: 990–1000.

ESPINA L. M., VALERO N. J., HERNANDEZ J. M. & MOSQUERA J. A. 2003. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor- α caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 68: 48-53.

FALCONAR A. K. & YOUNG P. R, Immunoaffinity purification of native dimer forms of the flavivirus non-structural glycoprotein, NS1. *J. Virol. Methods* 30: 323–332;

FALCONAR A. K. 1997. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch. Virol.* 142: 897-916.

FIGUEIREDO L. T. M., FONSECA B. A. L. 2004. DENGUE. Em: Tratado de Infectologia. 2ªed. Vol.1 (VERONESI R., FOCACCIA R.) 13: 204-217, Editora Atheneu, São Paulo.

FLINT M., MAIDENS C., LOOMIS-PRICE L. D., SHOTTON C., DUBUISSON J., MONK P., HIGGINBOTTOM A., LEVY S. & MCKEATING J. A. 1999. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J. Virol.*; 73 (8): 6235–6244.

GARRINGTON T. P. & JOHNSON G. L. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11 (2): 211-218.

GAULD S. B., DAL PORTO J. M. & CAMBIER J. C., 2002. B cell antigen receptor signaling: Roles in cell development and disease. *Science*; 296: 1641-1642.

GOLDSBY R.A., KENDT T.J., OSBORNE B.A. 2000. Kuby Immunology, 4th Edition, WH Frieman and Company, 200.

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. 1999. Early immune activation in acute Dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J. Infect. Dis.*; 179: 755-762.

HALSTEAD S. 1970. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion. *J. Biol. Med.*; 42: 350-362.

HALSTEAD S. B. L. & O'ROURKE E. J. 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes - I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J. Exp. Med.*; 146: 201-217.

HASE T., SUMMERS P. L., ECKELS K.H. 1989. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch. Virol.*; 104: 129-143.

HEMLER M. E., 2005. Tetraspanins functions and associated microdomains *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*; 6(10): 801-11.

HIRANO T. 1994. Interleukin-6. In: *The cytokine handbook*, 2nd ed. (A. W. THOMSON ed.); 145-168.

HUERRE M. R., LAN N. T., MARIANNEAU P., HUE N. B., KHUN H., HUNG N. T., KHEN N. T., DROUET M. T., HUONG V. T., HA D. Q., BUISSON Y. & DEUBEL V. 2001. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch.*; 438: 107-115.

HIGGINBOTTOM A., QUINN E. R., KUO C. C., FLINT M., WILSON L. H., BIANCHI E., NICOSIA A., MONK P. N., MCKEATING J. A. & LEVY S. 2000. Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J. Virol.*, 74: 3642–3649.

HOBER H., POLI L., ROBLIN B., GESTAS P., CHUNGUE E., GRANIE G., IMBERT P., PECARERE J. L., VERGEZ-PASCAL R., WATTRE P. & MANIEZ-MONTREUIL M. 1993. Serum level of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue infected patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48: 324-331.

HUANG Y. H., LEI H. Y., LIU H. S., LIN Y. S., LIU C. C. & YEH T. M. 2000, Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 Pproduction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 63 (1,2): 71-75.

HUANG K. J., YANG Y. C., LIN Y. S., HUANG J. H., LIU H. S., YEH T. M., CHEN S. H., LIU C. C. & LEI H. Y. 2006. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J. Immunol.*; 176: 2825-2832.

JOHNSON G. L. & LAPADAT R. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912.

JUFFRIE M., VD MEER G. M, HACK C. E., HAASNOOT K., SUTARYO, VEERMAN A. J. P. & THIJS L. G., 2001. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65 (1): 70–75.

KEELAPANG P., SRIBURI R., SUPASA S., PANYADEE N., SONGJAENG A., JAIRUNGSRI A., PUTTIKHUNT C., KASINRERK W., MALASIT P. & SITTISOMBUT N. 2004. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. *J Virol.*; 78 (5): 2367–2381.

KOU Z., QUINN M., CHEN H., RODRIGO W. W., ROSE R. C., SCHLESINGER J. J., JIN X. 2008. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Virol.*; 80 (1): 134-146.

LANCIOTTI R. S, CALISHER C. H., GUBLER D. J., CHANG G. J. & VORNDAM A. V. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30(3): 545-551.

LANKESTER A.C., VAN SCHIJNDEL G. M., ROOD P. M., VERHOEVEN A. J. & VAN LIER R. A. 1994. B cell antigen receptor cross-linking induces tyrosine phosphorylation and membrane translocation of a multimeric Shc complex that is augmented by CD19 co-ligation. *Eur. J. Immunol.*; 24 (11): 2818-2825.

LEI H. Y., YEH T. M., LIU H. S., LIN Y. S., CHEN S. H. & LIU C. C. 2001. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J. Biomed Sci*; 8: 377-388.

LIBRATY D. H., PICHYANGKUL S., AJARIYAKHAJORN C., ENDY T. P. & ENNIS F. A. 2001. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J. Virol.*; 75: 3501-3508.

LIM H. Y. & NG M. L. 1999. A different mode of entry by dengue-2 neutralisation escape mutant virus. *Arch. Virol.*; 144: 989-995.

LIMA-CAMARA T. N., HONÓRIO N. A. & OLIVEIRA R. L., 2006. Frequency and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad. Saúde Pública*; 22 (10): 2079-2084.

LIN C. F., CHIU S. C., HSIAO Y. L., WAN S. W., LEI H. Y., SHIAU A. L., LIU H. S., YEH T. M., CHEN S. H., LIU C. C. & LIN Y.S. 2005. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J. Immunol.*; 174: 395-403.

LIN C. F., LEI H. Y., LIU C. C., LIU H. S., YEH T. M., WANG S. T., YANG T. I., SHEU F. C., KUO C. F. & LIN Y.S. 2001. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J.Med. Virol.*; 63 (2): 143-149.

LIN C. F., LEI H. Y., SHIAU A. L., LIU H. S., YEH T. M., CHEN S. H., LIU C. C., CHIU S. C. & LIN Y.S. 2002. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus non-structural protein 1 via production of NO. *J. Immunol.*; 169: 657-664 (b).

LIN Y. W., WANG K. J., LEI H. Y., LIN Y. S., YEH T. M., LIU H. S., LIU C. C. & CHEN S. H. 2002. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J.Virol.*; 76: 12242-12249 (a).

LINDENBACH B. D., EVANS M. J., SYDER A. J., WOLK B., TELLINGHUISEN T. L., LIU C. C., MARUYAMA T., HYNES R. O., BURTON D. R., MCKEATING J. A. & RICE C. M. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*; 309 (5734): 623-626.

LINDENBACH B. D. & RICE C. M. 2001. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*, 4th ed., (D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds); 991-1041.

MACHIDA K., CHENG K. T. -H, PAVIO N., SUNG V. M. -H. & LAI M. M. C. 2005. Hepatitis C virus E2-CD81 interaction induces hypermutation of the immunoglobulin gene in B cells. *J. Virol.*; 79 (13): 8079–8089.

MAECKER T. H & LEVY S. 1997. Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. *J. Exp. Med.*, 185 (8), 1505–1510.

MALAVIGE G. N., FERNANDO S., FERNANDO D. J. & SENEVIRATNE S. L. 2004. Dengue viral infections. *Postgrad. Med. J.*; 80: 588-601.

MANDEL B. 1976. Neutralization of poliovirus: a hypothesis to explain the mechanism and the one hit character of the neutralization reaction. *Virology*; 69: 500-510.

MARTIN F., ROTH D. M., JANS D. A., POUTON C. W., PARTRIDGE L. J., MONK P. N., & MOSELEY G. W. 2005. Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology? *J. Virol.*; 17 (69): 10839–10851.

MARTÍNEZ-BARRAGÁN J. J. & DEL ANGEL R. M. 2001. Identification of a putative coreceptor on vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J. Virol.*; 75: 7818–7827.

MATHEW A., KURANE I., ROTHMAN A. L., ZENG L. L., BRINTON M. A. & ENNIS F. A. 1996. Dominant recognition by human CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. *J. Clin. Invest.*; 98 (7):1684-1691.

MATSUMOTO A. K., KOPICKY-BURD J., CARTER R. H., TUVESON D. A., TEDDER T. T. & FEARON D.T. 1991. Interaction of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte containing complement receptor type 2 and CD19. *J. Exp. Med.*; 173: 55-64.

MEMORANDA. 1973. Pathogenetic mechanisms in dengue hemorrhagic fever: report of an international collaborative study. *Bull World Health Organ.*; 48 (1): 117-133.

MIGUEZ-BURBANO M. J., JARAMILLO C. A., PALMER C. J., SHOR-POSNER G., VELÁSQUEZ L. S., LAI H. & BAUM M. K. 1999. Total immunoglobulin E levels and dengue infection on San Andres Island, Colombia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6: 624–626.

MILLER J. L., DEWET B. J. M., MARTINEZ-POMARES L., RADCLIFFE C. M., DWEK R. A., RUDD P. M. & GORDON S. 2008. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog.*; 4 (2): 0001-0011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2008. Vigilância em Saúde- Dengue. Situação atual da doença.

MIYAZAKI T., MÜLLER U. & CAMPBELL K. S. 1997. Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *The EMBO Journal*; 16 (14): 4217–4225.

MODIS Y., OGATA S., CLEMENTS D. & HARRISON S. C. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*; 427: 313-319.

MYINT K. S., ENDY T. P., MONGKOLSIRICHAIKUL D., MANOMUTH C., KALAYANAROOJ S., VAUGHN D. W., NISALAK A., GREEN S., ROTHMAN A. L., ENNIS F. A. & LIBRATY D. H. 2006. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J. Infect. Dis.*; 194: 600-607.

NAKA K., DANSAKO H., KOBAYASHI N., IKEDA M. & KATO N. 2006. Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing interferon-beta via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes. *Viol.*; 346: 348-362.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). 2006. Fact Sheet: The History of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) in the Region of the Americas, 1635-2001.

PANTEVA M., KORKAYA H. & JAMEEL S. 2003. Hepatitis viruses and the MAPK pathway: is this a survival strategy? *Virus Research*; 92: 131132 -131140.

PENG S. L. 2005. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 17: 230-236.

PLETNEV A. G., BRAY M. & LAI C. J. 1993. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J. Virol.*; 67: 4956-4963.

PRYOR M. J., CARR J. M., HOCKING H., DAVIDSON A. D., LI P. & WRIGHT P. J. 2001. Replication of dengue virus type 2 in human monocytes derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 65: 427-434.

REED L. J. & MUENCH H. 1938. A simple method of estimating 50 per cent end-points. *Amer. Jour. Hygiene*; 27: 493-497.

REN J., DING T., ZHANG W., SONG J. & MA W. 2007. Does Japanese encephalitis virus share the same cellular receptor with other mosquito-borne flaviviruses on the C6/36 mosquito cells? *Viol. J.*; 4: 83-90.

REYES-DEL VALLE J., CHÁVEZ-SALINAS S., MEDINA F. & DEL ANGEL R. M. 2005. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J. Virol.*; 79 (8): 4557–4567.

RETH M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature*; 338: 383-384.

RICE C. M. & STRAUSS J. H. 1986. Structure of the Flavivirus genome. In: Schlesinger S, Schlesinger M. The Togaviridae and Flaviviridae. *Plenum*; 279-327.

RICO-HESSE R., HARRISON L., SALAS R., TOVAR D., NISALAK A., RAMOS C., BOSHELL J., RDE MESA M., NOGUEIRA R. & DA ROSA A T. 1997. Origins of dengue 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*; 230: 244-251.

ROBINSON M. J. & COBB M. H. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.*; 9 (2): 180-186.

ROEHRIG J. T., VOLPE K. E., SQUIRES J., HUNT A. R., DAVIS B. S. & CHANG G. J., 2004. Contribution of disulfide bridging to epitope expression of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. *J. Virol.*; 78 (5): 2648-2652.

ROLDAN E., RODRIGUEZ C., NAVAS G., PARRA C. & BRIEVA J. A. 1992. Cytokine network regulating terminal maturation of human bone marrow B cells capable of spontaneous and high rate Ig secretion in vitro. *J. Immunol.*; 149: 2367-2371.

ROSA D., SALETTI G., DE GREGORIO E., ZORAT F., COMAR C., D'ORO U., NUTI S., HOUGHTON M., BARNABA V., POZZATO G. & ABRIGNANI S. 2005. Activation of naïve B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 102 (51): 18544–18549.

ROSEN L., ROZEBOOM L. E., SWEET B. H. & SABIN A. B. 1954. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 3: 878-882.

ROTHMAN A. L. & ENNIS F. A. 1999. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*; 257: 1-6.

SALAZAR M. I., RICHARDSON J. H., SANCHEZ-VARGAS I., OLSON K. E. & BEATY B. J. 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.*; 7: 9-24.

SCHAMEL W. & RETH M. 2000. Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Imunity*; 13: 5-14.

SCOTT R. M., NISALAK A., CHEAMUDON U., SERIDHORANAKUL S. & NIMMANNITYA S. 1980. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.*; 141: 1-6.

SHIBA K., STOHL W., GRAY J. D. & HORWITZ D. A. 1990. A novel role for accessory cells in T cell-dependent B cell differentiation. *Cell. Immunol.*; 127 (2): 458-469.

SHOHAM T., RAJAPAKSA R., BOUCHEIX C., RUBINSTEIN E., POE J. C., TEDDER T. F. & LEVY S. 2003. The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a postendoplasmic reticulum compartment. *J. Immunol.*, 171: 4062-4072.

SILVESTRI F., PIPAN C., BARILLARI G., ZAJA F., FANIN R., INFANTI L., RUSSO D., FALASCA E., BOTTA G. A. & BACCARANI M. 1996. Prevalence of hepatitis C virus infection in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood*; 87: 4296-4301.

SNAPPER C. M. & PAUL W. E. 1987. B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.*; 139 (1): 10-17.

STIPP C. S., KOLESNIKOVA T. V. & HEMLER M. E. 2001. EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J. Biol. Chem.*; 276: 40545–40554.

TAKATSU K. 1997. Cytokines involved in B-cell differentiation and their sites of action. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; 215 (2): 121-133.

TASSANEETRITHEP B., BURGESS T. H., GRANELLI-PIPERNO A., TRUMPFHELLER C., FINKE J., SUN W., ELLER M. A., PATTANAPANYASAT K., SARASOMBATH S., BIRX D. L., STEINMAN R. M., SCHLESINGER S. & MAROVICH M. A. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.*; 197 (7): 823–829.

TSAI Y. T., CHANG S. Y., LEE C. N. & KAO C. L. 2009. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell. Microbiol.* 11 (4): 604-615.

VAN DER SCHAAR H. M., RUST M. J., CHEN C., VAN DER ENDE-METSELAAR H., WILSCHUT J., ZHUANG X. & SMIT J. M. 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single- particle tracking in living cells. *PLoS. Pathog.* 4(12): e1000244.

YOUNG P. R., HILDITCH P. A., BLETCHLY C. & HALLORAN W. (2000) An antigen capture enzymelinked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.*; 38: 1053–1057.

ZHAO L. J., ZHANG X. L., ZHAO P., CAO J., CAO M. M., ZHU S. Y., LIU H. Q. & QI Z. T. 2006. Up-regulation of ERK and p38 MAPK signaling pathways by hepatitis C virus E2 envelope protein in human T lymphoma cell line. *J. Leukoc. Biol.*; 80 (2): 424-342.

ZHANG Y, CORVER J., CHIPMAN P. R., ZHANG W., PLETNEV S. V., SEDLAK D., BAKER T. S., STRAUSS J. H., KUHN R. J. & ROSSMANN M. G. 2003. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.*; 22 (11): 2604-2613.

WAGNER H. 2004. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol.*; 25: 381–386.

WANG J. P., LIU P., LATZ E., GOLENBOCK D. T., FINBERG R. W. & LIBRATY D. H.
2006 . Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7
signaling beyond endosomal recognition. *J. Immunol.*; 177: 7114–7121.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)