

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARIANA GANDINI

**IMUNIDADE INATA NA INFECÇÃO VIRAL: PERFIL DE INFECÇÃO *IN VITRO*
DE FLAVÍVIRUS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Claire Fernandes Kubelka

RIO DE JANEIRO

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / ICICT / FIOCRUZ – RJ

G195

Gandini, Mariana

Imunidade inata na infecção viral : perfil de infecção in vitro de flavivírus em células dendríticas humanas / Mariana Gandini. – Rio de Janeiro: 2009.

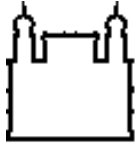
xvi, 100 f. : Il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2009.

Bibliografia: f. 85-100

1. Vírus – dengue. 2. Febre amarela vacinal. 3. Células dendríticas. 4. Citocinas. I. Título

CDD 616 921



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: MARIANA GANDINI

**IMUNIDADE INATA NA INFECÇÃO VIRAL: PERFIL DE INFECÇÃO *IN VITRO*
DE FLAVÍVIRUS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS**

ORIENTADORA: Dra. Claire Fernandes Kubelka

Aprovada em: 15/04/2009

EXAMINADORES:

Dra. Adriana Lima Vallochi - **Presidente**
Dra. Luciana Barros de Arruda Hinds
Dra. Roberta Olmo Pinheiro

Rio de Janeiro, 15 de junho de 2009

Dedico esta dissertação aos meus pais Luiz e Miriam, ao meu companheiro Alexandre, ao meu irmão Gabriel e aos meus avós maternos. O apoio e a confiança de vocês foram fundamentais. Muito obrigada!

“ You can't jump the track. We're like cars on a cable and life's like an hourglass, glued to the table. No one can find the rewind button, girl! So cradle your head in your hands and breathe, just breathe... “ *Anna Nalick*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luiz e Miriam, meus irmãos Felipe e Gabriel e meu amigo e companheiro Alexandre pelo amor, carinho, apoio e amizade. Obrigada por me ensinarem a ser paciente e persistente sempre!

Aos meus queridos avós Therezinha e Miranda, por todo incentivo e carinho dispensados em todos os momentos da vida.

A todos os meus amigos que sempre estiveram ali todas as vezes que as forças me faltaram, sempre com palavras de incentivo e carinho. Igor e Juan, apesar da distância, obrigada pelos momentos felizes e pelo alento que vocês me proporcionam.

À toda equipe do Laboratório de Imunologia Viral, verdadeiros amigos: Sônia, Naide, Luzia, Denise, Amanda, Lidiane, Maryrose e Waldir, Luciana(s), Cíntia, Laís e Carol. Muito obrigada pelas inúmeras horas de trabalho, risos e brincadeiras.

À meus amigos e colegas da turma de Mestrado da Biologia Parasitária, por todas as risadas e *nights* na quadra.

À Dr^a. Claire Kubelka, por ter aceitado me orientar neste trabalho, pelas oportunidades concedidas e por todo ensinamento ministrado.

Aos integrantes da banca, pela gentileza de aceitarem o convite.

Ao CNPq, FAPERJ e à FIOCRUZ pelo apoio científico e financeiro.

À todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Organização estrutural do vírus DENV.	6
Figura 1.2: Estimulação de células T e polarização T <i>helper</i> (Th1)/Th2 necessita de três sinais derivados de células dendríticas.	26
Figura 4.1: Caracterização fenotípica das populações de monócitos e de células dendríticas derivadas de monócitos periféricos humanos.	50
Figura 4.2: Infecção de culturas de células dendríticas diferenciadas de monócitos com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	52
Figura 4.3: Expressão de CD38 na região R1 de MoDCs durante infecção com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	54
Figura 4.4: Expressão de OX40L na região R1 de MoDCs durante infecção com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	56
Figura 4.5: Detecção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	58
Figura 4.6: Detecção de IFN- α nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	59
Figura 4.7: Taxa de detecção de TNF- α /IFN- α nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	60
Figura 4.8: Detecção de IL-6 nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	61
Figura 4.9: Detecção de IL-1Ra nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	62

Figura 4.10: Detecção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	64
Figura 4.11: Detecção de MIP-1 β /CCL4 nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	65
Figura 4.12: Detecção de MCP-1/CCL2 nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	66
Figura 4.13: Detecção de IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5 nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD.	67

LISTA DE TABELAS

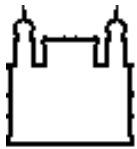
Tabela 4.1: Comparação da produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de MoDCs 48 horas após infecção com DENV-2 e FAVac.	57
Tabela 4.2: Correlação entre os níveis de detectados de TNF- α , IL-10 e IL-1Ra com a taxa de células positivas para Ag virais ou para o marcador CD38 em culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 ou FAVac.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC = Citotoxicidade celular mediada por anticorpos (do inglês *antibody dependent cell toxicity*)
ADE = Facilitação dependente de anticorpo (do inglês *antibody-dependent enhancement*)
ADN = Ácido desoxirribonucleico
ALT = Alanina aminotransferase
AP-1 = Fator de transcrição proteína ativadora-1 (do inglês *activating protein-1*)
APC = Célula apresentadora de antígeno (do inglês *antigen-presenting cell*)
ARN = Ácido ribonucleico
BDCA-2 = Antígeno de célula dendrítica do sangue (do inglês *blood dendritic cell antigen*)
BSA = Albumina sérica bovina (do inglês *bovine serum albumin*)
CCL = Ligante de quimiocina motivo CC
CCR = Receptor de quimiocina motivo CC
cDC = Célula dendrítica convencional (do inglês *conventional dendritic cell*)
CMV = Citomegalovírus
CXCL = Ligante de quimiocina motivo CXC
CXCR = Receptor de quimiocina motivo CXC
DC = Célula dendrítica (do inglês *dendritic cell*)
DC-SIGN = Ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de DC (do inglês *DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin*)
DENV = Vírus da Dengue
DSAC = Dengue com sinais associados ao choque
ELISA = Método Imunoenzimático (do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)
ERK = Proteína regulada por sinais extracelulares (do inglês *extracellular signal-regulated protein*)
FAV = Vírus da Febre Amarela
FAVac = Vírus Febre Amarela Vacinal
Fc = Fração constante de Imunoglobulina
Fc α R, Fc γ R, Fc ϵ R = Receptor para porção Fc de anticorpos classe A (α), γ (G), ϵ (E)
FD = Febre da Dengue
FHD = Febre Hemorrágica da Dengue
FITC = Isotiocianato de Fluoresceína (do inglês *fluorescein isothiocyanate*)
FLT3 = Tirosina quinase 3 relacionada ao FMS (do inglês *FMS-like tyrosine kinase 3*)
GM-CSF = Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
GRP78/BIP = Proteína reguladora de glicose 78
HBsAg = Antígeno S do vírus da hepatite B (do inglês *hepatite B S antigen*)
HCV = Vírus da Hepatite C
HepG2 = Linhagem de hepatócitos humanos
HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA = Antígeno leucocitário humano (do inglês *human leukocyte antigen*)
HTLV = Vírus T-linfotrópicos humanos
HRP = Peroxidase Horseradish
HUVEC = Células endoteliais de veia umbilical humana (do inglês *human umbilical vein endothelial cells*)
IFN = Interferon
IgG = Imunoglobulina G
IL = Interleucina
IL-1Ra = receptor antagonista de IL-1

imDCs = Células dendríticas imaturas (do inglês *imature dendritic cell*)
 iNOS = Óxido nítrico sintase induzida (do inglês *inducible nitric oxide sintase*)
 IP-10 = Proteína induzida por interferon gama 10 (do inglês *interferon-gamma-inducible protein-10*)
 IRF = Fator regulador de inteferon (do inglês *interferon regulatory factor*)
 ISRE = Elementos de resposta estimulados por interferon (do inglês *interferon stimulated response elements*)
 JAK = Quinase de Janus (do inglês *Janus Kinase*)
 JEV = Vírus da Encefalite Japonesa
 JNK = Quinase da proteína c-Jun (do inglês *c-Jun NH₂-terminal kinase*)
 LC = Célula de Langerhans (do inglês *Langerhans cells*)
 LPS = Lipopolissacarídeo
 MAPK = Quinase de proteínas ativadas por mitógenos (do inglês *mitogen-activated protein kinase*)
 MCP = Proteína quimioatratante de monócitos (do inglês *monocyte chemoattractant protein*)
 MDA-5 = Gene associado a diferenciação de melanoma (do inglês *melanoma differentiation-associated gene-5*)
 MHC = Complexo de histocompatibilidade principal (do inglês *major histocompatibility complex*)
 MIF = Fator de inibição de macrófagos (do inglês *macrophage migration inhibitory factor*)
 MIP = Proteína inflamatória de macrófago (do inglês *macrophage inflammatory protein*)
 MMP = Metaloproteinase de matriz (do inglês *matrix metalloproteinase*)
 MOCK = Sobrenadante de cultura celular
 MoDC = Células dendríticas derivadas de monócitos (do inglês *monocyte-derived dendritic cells*)
 MyD88 = Gene 88 de resposta primária à diferenciação mielóide (do inglês *myeloid differentiation primary-response gene 88*)
 NC = Nucleocapsídeo
 NF-κB = Fator de transcrição nuclear κB (do inglês *nuclear factor-κB*)
 NK = Célula *Natural Killer*
 NTR = Regiões não traduzidas (do inglês *non-translated regions*)
 OMS = Organização Mundial de Saúde
 OPAS = Organização Panamericana de Saúde
 ORF = Fase aberta de leitura (do inglês *open reading frame*)
 OX40L = Ligante da molécula OX40
 PBML = Leucócitos mononucleares do sangue periférico (do inglês *peripheral blood mononuclear leukocytes*)
 pDC = Célula dendrítica plasmacitoide (do inglês *plamacytoid dendritic cell*)
 PE = Ficoeritrina (do inglês *phycoerythrin*)
 PI3K = Quinase de fosfatidil inositol 3 (do inglês *Phosphatidylinositol-3 kinase*)
 Proteína C = Proteína do capsídeo
 Proteína E = Proteína do envelope
 Proteína M = Proteína de membrana
 Proteína NS = Proteína não estrutural (do inglês *nonstructural*)
 PRR = Receptores de reconhecimento de padrões moleculares (do inglês *pattern recognition receptors*)
 RANTES = regulada, expressa e secretada na ativação normal de células T (do inglês *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*)
 RIG-I = Gene induzido por ácido retinóico (do inglês *retinoic-acid inducible gene-1*)
 SCD = Síndrome do Choque da Dengue
 SFB = Soro Fetal Bovino
 SIV = Vírus da imunodeficiência dos símios

STAT = Transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês *signal transducer and activator of transcription*)
TAP = Transportador associado ao processamento antigênico
TCID₅₀ = Dose infectiva para 50% da cultura celular (do inglês *50% Tissue culture infective dose*)
TCR = Receptor de célula T (do inglês *T cell receptor*)
TGF- β = Fator de crescimento transformante- β (do inglês *transforming growth factor- β*)
Th = T auxiliar (do inglês *T helper*)
TIRAP = Proteína adaptadora com domínio TIR (do inglês *TIR-domain-containing adaptor protein*)
TLR = Receptor semelhante ao Toll (do inglês *Toll-like receptor*)
TMB = Tetrametilbenzidina
TNF- α = Fator de necrose tumoral- α (do inglês *tumor necrosis factor- α*)
TRAIL = Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (do inglês *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*)
TRAM = Molécula adaptadora relacionada ao TRIF (do inglês *TRIF-related adaptor molecule*)
TRIF = Proteína indutora de interferon- β e adaptadora com domínio TIR (do inglês *Toll/IL-1R(TIR) domain-containing adaptor protein inducing interferon- β*)
TSLP = Linfopoetina estromal tímica (do inglês *thymic stromal lymphopoietin*)
WNV = vírus do Oeste do Nilo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

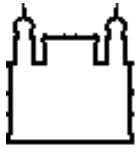
IMUNIDADE INATA NA INFECÇÃO VIRAL: PERFIL DE INFECÇÃO *IN VITRO* DE FLAVÍVIRUS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariana Gandini

Os flavivírus podem causar doenças infecciosas graves, entre elas a dengue e a febre amarela. O vírus Dengue (DENV) causa a arbovirose mais comum do mundo, apresentando um amplo espectro de manifestações clínicas, em que os quadros mais graves são caracterizados pela febre aguda, mialgia e extravasamento de plasma. A febre amarela é caracterizada por síndrome clínica semelhante ao DENV, porém controlada mediante vacinação eficaz e segura com vírus atenuado (FAVac). Já é um consenso que a patogenia dessas viroses envolva mecanismos de uma resposta imunológica exacerbada ao vírus. As células dendríticas são alvos para DENV e FAVac, sendo a primeira população celular a interagir com estes flavivírus na infecção natural e na vacinação, gerando a produção de citocinas e a ativação/maturação dessas células. Assim, estudamos as diferenças e semelhanças entre DENV-2 (16681) e o FAVac (17DD) mediante infecção de células dendríticas diferenciadas de monócitos (MoDCs). Ambos flavivírus são capazes de infectar células dendríticas *in vitro*, porém possuem manifestações clínicas distintas *in vivo*, embora a imunidade protetora seja sempre gerada. Observamos a maior detecção de antígenos virais em MoDCs para o DENV-2 em relação ao FAVac em doses equivalentes do inóculo, corroborando a baixa virulência do vírus vacinal. Em concentração cinco vezes maior, o FAVac apresentou taxas de replicação semelhantes ao DENV-2. Ambos os flavivírus foram capazes de aumentar a expressão da molécula de maturação/ativação CD38 e diminuir a expressão de OX40L, em relação ao MOCK. A infecção de MoDCs pelos dois flavivírus estudados induziu a produção de várias citocinas em comparação com as culturas controle. Observamos que o TNF- α está significativamente aumentado nas culturas infectadas com DENV-2 em relação ao FAVac, corroborando papel dessa citocina na imunopatogenia do dengue. O TNF- α pode induzir a expressão de CD38 pelas células dendríticas na presença do vírus. IL-6, IL-10 e IL-1Ra foram estimuladas pelos dois vírus, mas não foram detectadas diferenças marcantes entre eles. A produção de IL-10 e IL-1Ra frente infecção viral apresenta uma cinética semelhante, sugerida pela correlação positiva encontrada entre essas duas citocinas. A produção de IL-1Ra poderia estar afetando a replicação do DENV-2, mas possivelmente não a do FAVac. O IFN- α foi produzido em níveis mais elevados pelo vírus FAVac, ainda que inoculado na dose equivalente a usada pelo DENV-2. Ambos flavivírus induziram uma produção das quimiocinas MIP-1 β , MCP-1, RANTES e IP-10, com uma tendência a maior produção pelo FAVac, exceto para o MIP-1 β . Essas quimiocinas atrairiam outras populações celulares como células *Natural Killer*, monócitos e células T, colaborando para o controle da infecção viral. Sugerimos, então, a participação da citocina IFN- α na imunidade vacinal e do TNF- α , como fator preditivo de gravidade na Febre da Dengue.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IMUNIDADE INATA NA INFECÇÃO VIRAL: PERFIL DE INFECÇÃO *IN VITRO* DE FLAVÍVIRUS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariana Gandini

Flaviviruses cause severe infections, including Dengue and Yellow Fever. Dengue virus (DENV) is a disease broadly distributed worldwide, characterized by several clinical manifestations such as acute fever, myalgia and plasma leakage. Yellow Fever can cause similar clinical syndromes to Dengue, but its control was achieved by safe and effective vaccination with live attenuated virus (YFVac). It is a common sense that an exacerbated immune response can explain virus pathogenesis for these infections. Dendritic cells are targets for DENV and YFVac and are the first cell population to interact with those viruses during natural infection, resulting in cytokine production and cell maturation/activation. Differences and similarities between DENV-2 (16681) and YFVac (17DD) monocyte derived dendritic cell (MoDCs) infections were studied. Both viruses are able to infect dendritic cell and induce protective immunity but they induce different clinical manifestations. Higher viral antigen detection in MoDCs was observed for DENV-2 as compared to equivalent dose YFVac. These data support a low virulence for vaccinal virus. Similar replicative levels were detected for both viruses when a 5 times higher dose of YFVac was inoculated in culture. Enhanced expression of maturation/activation CD38 molecule and diminished expression of OX40L were observed in MoDCs infected with both flaviviruses as compared to MOCK-infection. Several cytokines were produced in response to flavivirus infection of MoDCs compared to MoDCs MOCK-infected. TNF- α was significantly elevated in DENV-2 infected MoDCs compared to FAVac, indicating a role for this cytokine in Dengue immunopathogenesis. Virus-induced TNF- α may be enhancing CD38 expression by infected MoDCs. No significant differences were observed for virus-induced IL-6, IL-10 and IL-1Ra production although higher cytokine levels were observed when compared to MOCK-infection. IL-10 and IL-1Ra production were positively correlated with each other suggesting a similar production kinetics. Virus replication may be affected by IL-1Ra production since cytokine was associated with antigen positive cell rates for DENV-2 but not for YFVac. Higher levels of IFN- α were produced by YFVac-infected MoDCs even for dose equivalent FAVac. Both viruses induced MIP-1 β , MCP-1, RANTES and IP-10 chemokine production by infected MoDCs. A tendency for higher chemokine production was observed for FAVac except for MIP-1 β . NK cells, monocytes and T cells are attracted to sites of infection by those chemokines, supporting viral clearance. Collected data suggests a role for IFN- α in vaccinal immunity and TNF- α as a predictor of severity in Dengue Fever.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A Febre da Dengue	2
1.1.1. Histórico e Epidemiologia	2
1.1.2. O Ciclo de Transmissão.....	4
1.1.3. O Vírus Dengue - DENV	4
1.1.3.1. O gênero Flavivirus	4
1.1.3.2. Características Estruturais dos Flavivírus	5
1.1.4. Sítios de Infecção.....	8
1.1.5. Manifestações Clínicas	8
1.1.6. Patogênese da FD	10
1.1.6.1. Teoria da Facilitação Dependente de Anticorpos	10
1.1.6.2. Teoria da Virulência Viral	10
1.1.6.3. Teoria do Polimorfismo Genético.....	11
1.1.6.4. Teoria do “Pecado Original”	11
1.1.6.5. Imunopatogênese da Dengue	12
1.2. A Febre Amarela.....	16
1.2.1. Histórico e Epidemiologia	16
1.2.2. Manifestações Clínicas e Patogenia.....	17
1.2.3. Vacinas Contra Febre Amarela	17
1.2.4. Mecanismos de Ação das Vacinas 17D	20
1.3. As Células Dendríticas.....	22
1.3.1. Populações de Células Dendríticas Humanas	22
1.3.2. Captura de Antígenos pelas Células Dendríticas.....	23
1.3.3. Maturação e Migração de Células Dendríticas	24
1.3.4. Interação entre as Células Dendríticas e as Células T	25
1.3.5. As Células Dendríticas e as Citocinas	27
1.3.6. As Células Dendríticas nas Infecções Virais.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Cepas virais	36

3.2.	Produção e titulação das massas virais	36
3.2.1.	Meio de cultura e cultivo de células Vero	36
3.2.2.	Produção do estoque viral.....	36
3.3.	Titulação viral por ensaio de diluição seriada.....	37
3.4.	Leucócitos mononucleares do sangue periférico.....	39
3.4.1.	Obtenção de monócitos.....	39
3.4.2.	Derivação de células dendríticas	39
3.4.3.	Infecção das culturas de células dendríticas.....	40
3.5.	Citometria de Fluxo	40
3.5.1.	Marcação extracelular para marcadores de superfície.....	40
3.5.2.	Marcação intracelular para antígeno viral	41
3.6.	Detecção de citocinas nos sobrenadantes das culturas	42
3.7.	Análises estatísticas	43
3.8.	Material e reagentes.....	44
3.8.1.	Meios de Cultura.....	44
3.8.2.	Reagentes	44
3.8.3.	Soluções.....	45
3.8.3.1.	Soluções para Citometria de Fluxo	45
3.8.3.2.	Soluções para ELISA.....	46
3.8.4.	Anticorpos.....	47
4.	RESULTADOS	48
4.1.	Caracterização morfológica e fenotípica de culturas de células dendríticas derivadas de monócitos periféricos humanos.....	49
4.2.	Interações entre as MoDCs e os vírus DENV-2 e FAVac.....	51
4.2.1.	Cinética de infecção dos vírus DENV-2 e FAVac	51
4.2.2.	Expressão dos marcadores de maturação/ativação CD38 e OX40L nas MoDCs infectadas	53
4.2.3.	Detecção de citocinas produzidas nos sobrenadantes pelas culturas de MoDCs infectadas	57
5.	DISCUSSÃO.....	69
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	82
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Febre da Dengue

A Febre da Dengue (FD) é uma infecção que pode causar desde manifestações clínicas brandas como também manifestações graves com morbidade e letalidade frequentes, conhecida como Febre Hemorrágica do Dengue (FHD). Ela é causada pelos vírus Dengue, pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. Existem quatro sorotipos do vírus: Dengue-1 (DENV-1), Dengue-2 (DENV-2), Dengue-3 (DENV-3) e Dengue-4 (DENV-4), que são classificados de acordo com critérios imunológicos e biológicos [1, 2] e todos sorotipos são capazes de causar o amplo espectro de quadros patológicos da Dengue [3].

A FD se tornou a arbovirose (doença transmitida por artrópodes) mais difundida no mundo e está presente em todos os continentes, atingindo mais de 100 países. As áreas tropicais são as mais atingidas pelo fato de estarem densamente povoadas pelo mosquito transmissor *Aedes aegypti*, que é responsável pela manutenção do ciclo de transmissão do vírus [4]. Não existem vacinas licenciadas e nem terapêuticos específicos contra a doença. Atualmente, existem três e meio bilhões de pessoas com risco de contrair a doença. As estimativas indicam que anualmente ocorram cem milhões de casos da FD e quinhentos mil casos da FHD [1, 5].

1.1.1. Histórico e Epidemiologia

O DENV provavelmente foi originado em um ciclo silvestre entre mosquitos do gênero *Aedes* e primatas inferiores e, atualmente, esses vírus são muito bem adaptados aos mosquitos hospedeiros. A dispersão do DENV está intimamente ligada ao povoamento do vetor pelo mundo, iniciando-se durante a expansão comercial através das viagens de navios [3]. Nos séculos XX e XXI, a persistência do agente patogênico e seu transmissor continuam ligada a grande e rápida movimentação de carga humana através dos continentes, aliada ao aumento populacional humano e à urbanização descontrolada [3].

Os primeiros casos de FD bem documentados datam de 1779, em que foram observadas também manifestações hemorrágicas graves ou fatais. Entretanto, somente em 1954 observamos a emergência de epidemias FD no continente asiático na região da Tailândia e das Filipinas. O cenário da Segunda Guerra Mundial interferiu na estrutura epidemiológica local, gerando os desmatamentos e o aumento da população; o que intensificou o contato do *Aedes aegypti* com o homem e propiciou a colonização do mosquito vetor no sudoeste asiático e em regiões do Pacífico. Atualmente, o sudoeste asiático é hiperendêmico para todos os sorotipos do vírus [6].

Nas Américas, as primeiras epidemias de FD foram registradas em 1818. Durante as décadas de 40 e 50 do século XX, a OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde) se empenhava no programa de erradicação do mosquito *Aedes*, que é vetor também do ciclo urbano do vírus da Febre Amarela. O sucesso do programa teria suprimido a ocorrência de grandes epidemias de DENV no continente americano. Entretanto, a descontinuação do programa propiciou a re-infestação do mosquito e o surgimento das epidemias de FD [3]. Em 1963, foi registrada na Jamaica e em Porto Rico a primeira epidemia de FD, sendo o DENV-3 o sorotipo responsável [7]. Um quadro de hipoendemicidade (um sorotipo circulante por país) foi caracterizado até o início da década de 80, pela presença de DENV-3. Foram registrados casos de DENV-2 na Jamaica e em Porto Rico em 1969; e de DENV-1 na Jamaica e em Cuba (1977) e em Porto Rico e na Venezuela (1978). Os primeiros relatos de uma doença mais grave nas Américas datam de 1981, em Cuba; e a Venezuela registra casos em 1989/90. A presença de uma cepa de DENV-2 proveniente do Vietnã foi relacionada com os casos fatais [3, 8].

No Brasil, o surgimento da FD diagnosticada laboratorialmente ocorreu na década de 80 com a entrada do DENV-1 pelo estado de Roraima, região Norte do país [9]. Em seguida, o DENV-1 também foi responsável pelas epidemias de 1986 em Alagoas, Ceará e Rio de Janeiro [10]; e de 1987 em Mato Grosso do Sul, Bahia e Pernambuco [11]. Em 1990, foi detectado o sorotipo DENV-2 pela primeira vez no Brasil, no estado do Rio de Janeiro, e a circulação simultânea do DENV-1 e DENV-2 foi correlacionada com o aparecimento dos primeiros casos de FHD no estado [12]. No Ceará, em 1994, foi relatada a circulação do sorotipo DENV-2 e foram diagnosticadas dezenas de casos de FHD em Fortaleza [13]. Em 1996 e 97, foram relatados respectivamente, casos de DENV-1 e DENV-2 no estado do Pará totalizando 17.440 indivíduos infectados [14]. Em 2001, foram detectados casos autóctones de DENV-3 no Rio de Janeiro [15]. Este sorotipo causou uma das maiores epidemias relatadas no país de FD/FHD no Rio de Janeiro [16].

Atualmente, o panorama epidemiológico da FD/FHD no Brasil apresenta um quadro de endemia com subseqüentes epidemias periódicas [17], ocorrendo a circulação autóctone dos 3 sorotipos [18]. Foram confirmados em 2006 o registro de 345.922 casos de FD no país, sendo desses 628 de FHD e a ocorrência de 67 óbitos, o que representa um aumento de 39% de casos em relação a 2005 [19]. Até a 35ª semana epidemiológica de 2008, o Brasil foi responsável pelo maior número de casos clínicos da doença nas Américas. Foram registrados no Brasil mais de 700.000 casos de FD e FHD, com 212 óbitos [20]. O surgimento do DENV-4 no país poderá aumentar ainda mais o número de casos de FHD, visto que o aumento da incidência de FHD foi correlacionado com presença de infecções seqüenciais [18].

1.1.2. O Ciclo de Transmissão

Como citado anteriormente, os mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (*A. aegypti*; *A. albopictus*; *A. polynesiensis*) são os principais transmissores do DENV. Dependendo da região geográfica, podemos encontrar diferentes densidades das espécies, porém o principal vetor transmissor é o *Aedes aegypti*. Ciclos silvestres e peri-domésticos são mantidos na natureza, tendo como hospedeiros mosquitos e macacos. Entretanto, o principal ciclo de transmissão envolvido em epidemias é o urbano.

Após o mosquito picar o ser humano, os DENV penetram na fêmea adulta. A primeira replicação ocorre no intestino delgado, atinge a hemocele e a hemolinfa, ganhando acesso aos tecidos do inseto. Ocorre uma segunda replicação nas glândulas salivares, permitindo a transmissão do vírus aos seres humanos numa próxima alimentação do mosquito. Os vírus também podem infectar o aparelho genital dos vetores, possibilitando a transmissão trans-ovariana do patógeno. Esse tipo de infecção, sem participação de seres humanos ou outros vertebrados, possivelmente é responsável pela manutenção do vírus em uma determinada região nos períodos inter-epidêmicos, porém a transmissão assintomática em humanos não pode ser descartada [1, 21].

1.1.3. O Vírus Dengue - DENV

1.1.3.1. O gênero *Flavivirus*

Através de ensaios bioquímicos e testes moleculares, a família *Flaviviridae* é composta dos gêneros *Hepacivirus*, *Pestivirus* e *Flavivirus* [22]. O gênero *Flavivirus* é o maior da família compreendendo mais de 70 vírus, sendo aproximadamente a metade destes causadores de doenças, destacando-se o DENV, o vírus da Febre Amarela (FAV) e o vírus do Oeste do Nilo (WNV). A maioria dos flavivírus são arbovírus, sendo aproximadamente 40 por mosquitos, 16 por carrapatos e 18 vírus têm vetor desconhecido [23]. Em geral, os flavivírus são zoonoses e encontramos vários hospedeiros intermediários descritos na natureza: pássaros, roedores, primatas e marsupiais. O DENV, entretanto, é uma exceção, por necessitar da manutenção do ciclo em seres humanos [24, 25].

O gênero *Flavivirus* pode ser agrupado por sequência nucleotídica, antigenicidade, patogenicidade, distribuição geográfica e associações ecológicas [25]. O agrupamento de acordo com a síndrome clínica característica descreve três grupos: vírus causadores de febre-artralgias-eritema, vírus causadores de febre hemorrágica com ou sem hepatite; e causadores de doenças neurológicas. O DENV é um agente etiológico clássico da síndrome febre-

artralgias-eritema, também se enquadrando nas febres hemorrágicas assim como o vírus da Febre Amarela. O WNV e o vírus da encefalite japonesa (JEV) são representantes do grupo causador de sintomas neurológicos [22, 26]. A filogenia molecular fornece uma divisão em *clusters*, nos quais são agrupados no IX os sorotipos do DENV, no VII, o FAV; e no *cluster* XIV o WNV e JEV [27]

Critérios sorológicos foram utilizados para detectar quatro sorotipos do vírus DENV. Na escala evolutiva, o primeiro a surgir foi o DENV-4, seguido pelo DENV-2, DENV-3 e DENV-1 [23]. Analisando-se o sequenciamento de nucleotídeos da região E/NS1 ou a sequência completa da proteína E, os sorotipos do DENV são divididos em genótipos que refletem o acúmulo da evolução sofrida pelos vírus. Assim, o DENV-1 é dividido em cinco genótipos [28, 29]. O DENV-2 é dividido em seis genótipos – Selvagem, Americano, Cosmopolita, Asiático I, Asiático II e Asiático-americano [28, 30, 31]. Quatro grupos genotípicos foram descritos para o DENV-3 e dois para o DENV-4 [32, 33].

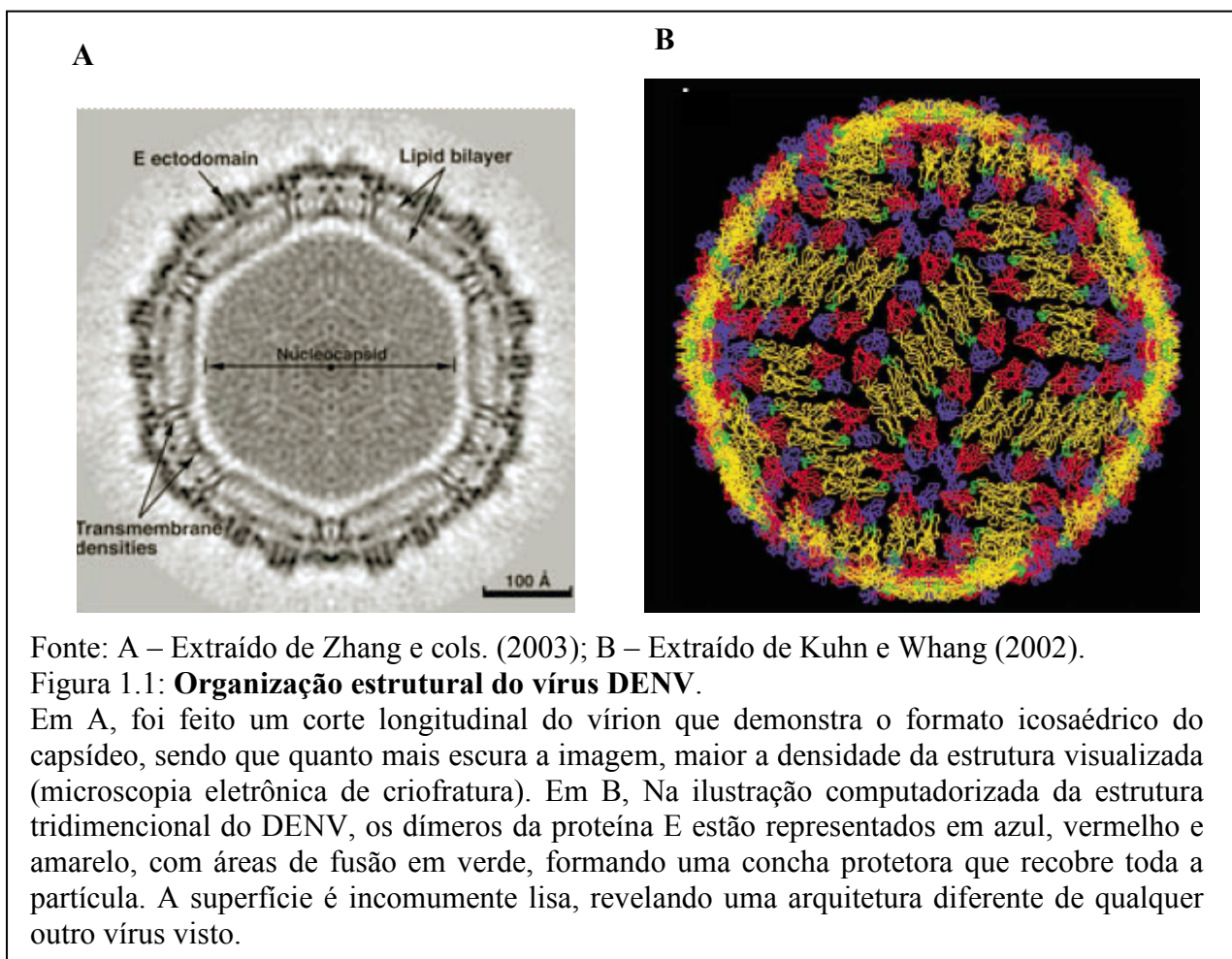
1.1.3.2. Características Estruturais dos Flavivírus

Os vírions dos membros do gênero *Flavivirus* têm diâmetro aproximado de 500Å e o seu genoma é composto de uma fita de ARN (ácido ribonucleico) simples com senso positivo. O material genético é envolto pela proteína do capsídeo e mais externamente pela membrana bilipídica da célula hospedeira com a inclusão de várias cópias de duas glicoproteínas virais [27].

O genoma dos flavivírus possui uma ORF (fase aberta de leitura) de 11Kb, codificando um único polipeptídeo. A porção amino terminal do genoma codifica as três proteínas formadoras da estrutura da partícula viral – a proteína do capsídeo (C), a proteína de membrana (M, transcrita como o precursor prM) e a proteína do envelope (E). O restante do genoma codifica sete proteínas não estruturais – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. O processo pós-tradução envolve a atuação de enzimas da célula hospedeira e virais resultando na clivagem do polipeptídeo em dez proteínas virais [34].

A estrutura externa do vírion (Figura 1.1) varia com o estado de maturação em que se encontra, principalmente no que se trata do dímero prM-E. Os vírions possuem 180 cópias desse dímero na camada mais externa da partícula, enquanto a camada mais interna deriva da membrana celular da célula hospedeira. As partículas imaturas possuem 90 heterodímeros de prM-E e nas 60 junções triméricas observamos espículas projetadas para a superfície do vírus. Já as partículas maduras apresentam 90 homodímeros de M-E formando uma superfície mais

lisa [35]. Internamente, o nucleocapsídeo é constituído pelas proteínas do capsídeo que envolvem o ARN viral [36].



As proteínas não-estruturais são fundamentais para a replicação viral. Durante o processo pós-tradução, o compartimento celular de destino define algumas funções dessas proteínas. A proteína NS1 é translocada para o lúmen do retículo endoplasmático, sendo exportada para o espaço extracelular [36]. A NS3 é encontrada no citoplasma, agindo como helicase de ARN, e a porção amino terminal é a protease para algumas proteínas virais durante a tradução, tendo como co-fator a NS2B. A NS5 é a polimerase de ARN dependente de ARN e também acumula a função metiltransferase [36]. A proteína NS4 possui duas subunidades que são encontradas como proteínas transmembranares. A NS4A está envolvida com alterações de membranas intracelulares cruciais para replicação [39], enquanto a NS4B auxilia a NS3 durante a replicação do ARN viral [40] e está envolvida no bloqueio da transdução de sinal da via dos interferons tipo I [41].

A penetração dos flavivírus nas células alvo é mediada por moléculas de fusão. Várias moléculas foram descritas por sua importância na penetração viral. A lecitina tipo C DC-SIGN (do inglês *dendritic cell ICAM-3 grabbing nonintegrin*) reconhece oligossacarídeos

com alta frequência de manose e glicanas fucosiladas. Alguns grupos descreveram o DC-SIGN como receptor necessário para a infectividade do DENV [42, 43], mas Lozach e colaboradores relataram a replicação do DENV DC-SIGN independente [44]. O FAV possui uma glicosilação a menos que o DENV e parece se ligar às células por via independente de lecitinas [45]. Recentemente, demonstrou-se a ligação de outro receptor de lecitina tipo C, o receptor de manose (MR), à proteínas do DENV, do JEV e do TBEV (vírus da encefalite do carrapato). Ao contrário do DC-SIGN residente nas membranas celulares, o MR é internalizado constitutivamente na via endocítica, ligando-se à manose, fucose e N-acetil glicosaminas presentes nas glicoproteínas virais e é considerado potencial receptor para o DENV [46]. Outros receptores para flavivírus foram descritos como GRP78/BiP (proteína reguladora de glicose 78), moléculas associadas ao CD14 [42, 47, 48] e heparan sulfato [49].

O ciclo replicativo dos flavivírus se inicia com a adsorção dos vírions na superfície celular via receptores de adesão e auxiliares, seguindo de internalização por endocitose. O ambiente ácido do endossoma cataliza a mudança conformacional na proteína E, resultando na fusão das membranas viral e celular, liberando o ARN no citoplasma. O material genético viral é traduzido em uma única poliproteína, processada por proteases virais e celulares. O genoma é replicado por polimerases virais e a montagem da partícula ocorre no retículo endoplasmático (RE). As proteínas do capsídeo e o ARN viral são envolvidos pelas glicoproteínas e pela membrana do RE, formando o vírion imaturo. As partículas são transportadas pela via secretória e na rede trans-Golgi de pH ácido, as furinas clivam as prM mediando a maturação viral. Os vírus maduros são liberados no citoplasma por exocitose [27, 50].

1.1.4. Sítios de Infecção

Nas infecções naturais, o DENV é inoculado pelo vetor no espaço subcutâneo ou no espaço intradérmico. A replicação viral ocorre no local, nas células retículo-endoteliais, células de Langerhans ou nos fibroblastos, que se encarregam de levar o vírus até os linfonodos regionais, favorecendo sua disseminação no sangue, preferencialmente nos monócitos [51]. Os antígenos virais já foram encontrados em células endoteliais; em macrófagos e células de Kupfer, em tecidos de casos fatais de órgãos de como fígado, cérebro, baço e pulmão [52-56].

Estudos *in vitro* confirmam a suscetibilidade de monócitos à replicação pelo DENV frente a outros tipos celulares [55, 57]. Várias linhagens epiteliais, endoteliais e fibroblásticas também suportam a replicação viral [58]. Wu e colaboradores (2000) demonstraram que células dendríticas (DCs) intersticiais e células de Langerhans são mais permissivas ao vírus que monócitos e macrófagos, fazendo das DCs principais alvos do DENV [59].

1.1.5. Manifestações Clínicas

Um amplo espectro de quadros clínicos pode ser causado pelo DENV. A doença pode se manifestar assintomaticamente ou apresentar sintomas brandos desde uma febre indiferenciada à FD; ou ainda, causar quadros mais graves como a FHD e a Síndrome do Choque da Dengue (SCD) [60].

A FD é uma doença não fatal que pode ocorrer tanto nas infecções primárias, quanto nas secundárias e afetar crianças e adultos. Caracterizam a doença: o aparecimento súbito de febre alta, dor de cabeça, dor retro-orbital, artralgia, mialgia, anorexia e desconforto abdominal. Eritemas máculo-papular podem ser detectados em alguns casos. A febre pode ser bifásica, tendendo a durar 2 a 7 dias. As manifestações hemorrágicas, apesar de incomuns na FD, podem ocorrer em alguns indivíduos [1, 4]. Em geral, os dados laboratoriais associados à FD incluem neutropenia com linfocitose subsequente, marcada pela presença de linfócitos atípicos. A trombocitopenia é também comum, 34% de pacientes com FD possuem contagem de plaquetas menor do que 100.000/mm³ [1, 4, 61].

Segundo a classificação utilizada pela OMS, as manifestações clínicas mais graves da FD são denominadas de FHD/SCD e ocorrem com maior frequência nas infecções secundárias. Os sintomas iniciais se assemelham à FD, porém as manifestações hemorrágicas evoluem rapidamente. A FHD é caracterizada por quatro grandes manifestações clínicas: febre alta, fenômenos hemorrágicos, e frequentemente, hepatomegalia e insuficiência circulatória [1, 4].

Em geral, são descritas três fases na progressão da doença: fase febril, de extravasamento do plasma e de convalescença. A fase crítica da FHD é iniciada no final da fase febril, em que podem surgir sinais de distúrbios circulatórios de graus variados. Alguns pacientes se recuperam espontaneamente e a maioria, após terapia de reposição de eletrólitos e fluidos. Em casos mais graves, em que a perda de plasma é crítica, o quadro de choque se instala. O choque é decorrente do aumento da permeabilidade vascular, seguida de hemoconcentração e falência circulatória, podendo levar o paciente ao óbito em 12 a 24 horas, se não for devidamente tratado [61]. A trombocitopenia e a hemoconcentração (hematócrito elevado) são dados laboratoriais típicos e são considerados pela OMS como indicadores da FHD. A hemoconcentração com o hematócrito 20% maior que o normal da população local evidencia o aumento da permeabilidade vascular e o extravasamento do plasma [1, 61].

A OMS classificou as manifestações clínicas da FHD, baseado em dados laboratoriais em: Grau I, febre com prova do laço positiva; Grau II, acrescido de hemorragias espontâneas leves; Grau III, presença de choque com pulso fraco e rápido; e Grau IV, choque profundo com pulso indetectável, sendo os dois últimos considerados como SCD [61]. Contrastando com esta classificação, foram relatados na Nicarágua por Harris e colaboradores (2000) quadros clínicos de SCD, que não foram enquadrados no esquema acima. Tendo em vista a dificuldade de classificar os casos graves segundo o critério da OMS, foi criada uma nova categoria a DSAC (Dengue com Sinais Associados ao Choque), quadro muito semelhante a SCD, porém sem presença de trombocitopenia e hemoconcentração [62]. Essa dificuldade na classificação dos casos graves tem sido comum entre países da América Central e América Latina [63].

Atualmente, os problemas encontrados em seguir os parâmetros da OMS na triagem dos casos graves de Dengue demonstram a necessidade de um estudo mais amplo que estabeleça um esquema de classificações que possa ser utilizado por todas regiões endêmicas [64]. Uma iniciativa apoiada pela OMS intitulada *Dengue Control* (DENCO) está realizando um estudo de avaliação dos sinais e sintomas associados com a gravidade e em breve deverá apresentar uma nova classificação clínica com o objetivo principal de orientar médicos na identificação precoce de casos graves [65, 66].

1.1.6. Patogênese da FD

Acredita-se que o ponto crítico da patologia da FHD é o extravasamento plasmático de curta duração mediado pela resposta imunológica do hospedeiro. Entretanto, a alta variabilidade de manifestações clínicas sugere que outros vários fatores influenciem por si só ou sinergisticamente, na gravidade da doença, como os fatores genéticos do hospedeiro, os genótipos e sorotipos virais, as infecções seqüenciais, e as diferenças qualitativas e quantitativas dos anticorpos e das respostas celulares cruzadas durante as infecções [67].

1.1.6.1. Teoria da Facilitação Dependente de Anticorpos

Geralmente, a resposta imunológica contra um sorotipo DENV garante imunidade protetora duradoura contra o sorotipo infectante, e por até 6 meses aos sorotipos restantes. Porém, dados epidemiológicos baseados na observação da frequência aumentada de FHD primária em crianças nascidas de mães flavivírus-ímmunes (anticorpos maternos adquiridos via placenta), sugerem que a presença desses anticorpos anti-DENV heterotípicos preexistentes é fator de risco para desenvolvimento da FHD [68-70].

Segundo a teoria da facilitação dependente de anticorpos (ADE), um aumento da infecção de células da linhagem monocítica ocorreria, facilitada pela ligação aos receptores FcR γ dos complexos vírus e anticorpos heterólogos sub-neutralizantes para o DENV [71, 72].

Entretanto, a importância da ADE ainda não foi formalmente demonstrada *in vivo*. Alguns trabalhos contestam essa teoria por não encontrarem associações entre a gravidade da infecção secundária e a existência dos anticorpos heterólogos, em ensaios *in vitro* [73]. E ainda, Wu e cols. e Libraty e cols. demonstraram que as DCs, altamente permissivas ao vírus, não sofrem fenômeno de ADE *in vitro* [59, 74].

1.1.6.2. Teoria da Virulência Viral

Além de ter sido atribuída às infecções secundárias, a FHD ocorre também em indivíduos com infecções primárias [75]. Aliando ao fato de que altos níveis de vírus circulante são detectados em pacientes com quadros mais graves [76], foi sugerido que a virulência das cepas contribui para a gravidade.

Conforme citado anteriormente, a classificação do DENV em genótipos permitiu a realização de estudos epidemiológicos e filogenéticos que correlacionaram grupos genotípicos com a incidência de FHD em populações de estado imunológico variado, propondo a teoria da virulência viral [8]. Observou-se que o genótipo americano raramente está associado à

FHD/SCD [77], enquanto o oposto ocorreria com as cepas asiáticas [78]. Entretanto, o aumento do número de casos graves nas Américas, pode ser explicado pela introdução de cepas com genótipo asiático no continente que teriam maior vantagem seletiva sobre as cepas americanas [28, 79].

Vários determinantes moleculares foram mapeados e correlacionados com um aumento da virulência das cepas e sorotipos analisados. Foram relatadas variantes na proteína E, nos sítios nas regiões não traduzidas (NTR) 3' e 5' e substituições de aminoácidos nas proteínas não-estruturais, correlacionadas com a virulência viral [77, 80, 81].

1.1.6.3. Teoria do Polimorfismo Genético

Estudos realizados no Haiti e na África, onde ocorre hiperendemicidade do DENV e raros casos de FHD são documentados, sugerem que indivíduos de etnia negra teriam maior resistência à FHD [82]. Verificou-se, então que fatores genéticos, evidenciados pelos polimorfismos nos genes, poderiam influenciar na suscetibilidade à FHD [83]. Foram observados alelos correlacionados com a gravidade no gene do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) [84], no gene do receptor FcR γ IIA [85], no promotor da molécula DC-SIGN [86]. Alelos do complexo de histocompatibilidade humano I foram correlacionados com gravidade e também com proteção [87, 88].

1.1.6.4. Teoria do “Pecado Original”

A teoria do “pecado original”, também observada em outras patologias, postula que a ativação de células T de memória heterotípicas estariam correlacionadas com a gravidade. As células T geradas durante a infecção primária são capazes de responder à peptídeos variantes durante a infecção secundária. A expansão de células T de memória preexistentes de baixa avides poderia sobrepor-se às células T virgens com maior avides para o sorotipo infectante, alterando o repertório de células T respondedoras. Essas células T prevalentes teriam alta capacidade de produção de citocinas e seriam menos efetivas na eliminação viral [89, 90].

Evidências para essa teoria incluem: maiores níveis de ativação de células T em pacientes mais graves em relação aos brandos, perfis alterados de citocinas nos pacientes graves e expansão preferencial de células T específicas para proteínas não estruturais (mais conservadas entre os sorotipos) com menor avides para o sorotipo infectante [75].

Estudos recentes analisaram variantes de epítomos de proteínas do DENV. Foram identificadas seqüências nas proteínas estruturais, mas a maioria nas proteínas não estruturais. Até o momento, a proteína NS3 foi reconhecida como imunodominante com vários epítomos

identificados. Em indivíduos vacinados com DENV atenuado, observou-se que certas variantes induziram as maiores respostas de citocinas. Ainda, peptídeos de DENV-2 e DENV-3 foram capazes de induzir as maiores resposta de citocinas nas células T CD4+ dos vacinados, não importando o sorotipo infectante primário [75, 91].

1.1.6.5. Imunopatogênese da Dengue

Como já citado anteriormente, as evidências sugerem que a intensidade da resposta imunológica tenha um papel fundamental na cascata patofisiológica durante a infecção por DENV, desencadeando o extravasamento de plasma. O papel dos mediadores solúveis da resposta imunológica na gravidade foi sugerido pela associação de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias com FHD/SCD [92].

Vitarana e cols. foram pioneiros na detecção dos altos níveis de TNF- α em pacientes com FHD, sugerido um papel fundamental no choque hipovolêmico [93]. Desde então, vários grupos relataram a presença do TNF- α em soro de pacientes com FD/FHD [94-99] e altos níveis dessa citocina foram correlacionados com as manifestações hemorrágicas [100]. Altos níveis de interleucina-6 (do inglês *interleukin-6* ou IL-6) são encontrados em pacientes com FHD/SCD e vários autores correlacionaram a presença da citocina com a gravidade da doença [101-103]. Nguyen e cols. (2004) relataram níveis significativamente elevados de IL-6 em recém-nascidos com infecção fatal, correlacionando-os com a ativação da via extrínseca de coagulação em casos de FHD/SCD [98] e com marcadores de coagulação e fibrinólise [104]. Em um estudo de coorte, foram detectados os maiores níveis de TNF- α em pacientes afro-colombianos com FD e FHD, enquanto que a IL-6 foi observada em maiores níveis em mestiços com FD [105]. Níveis de IL-18 foram encontrados aumentados em pacientes com FHD [63, 106]. A citocina interferon-gama (IFN- γ) encontrada em maiores níveis foi correlacionada com as infecções de resposta imunológica primária [96], porém recentemente o IFN- γ foi descrito como fator preditivo de gravidade em pacientes brasileiros [107]. Também foram relatadas altas concentrações da citocina antiviral IFN- α tanto em pacientes com FHD quanto com FD, porém seu papel na gravidade da doença ainda não foi totalmente elucidado [108].

Elevados níveis de IL-10 têm sido encontrados em pacientes com FD/FHD, frequentemente correlacionados com a infecção de resposta secundária/infecções sequenciais [109, 110]. A IL-10 também foi encontrada em casos fatais [101]. Azeredo e cols. encontraram uma correlação entre trombocitopenia e níveis elevados de IL-10 em pacientes brasileiros [111]. Níveis do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) foram associados com mortalidade [112].

A citocina fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) foi recentemente encontrada aumentada em casos fatais, sendo considerada então um fator preditivo de gravidade [101]. A quimiocina proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 β foi recentemente correlacionada com bom prognóstico em pacientes brasileiros [107]. Através de detecção do perfil genético, observou-se um aumento da expressão das quimiocinas IP-10/CXCL10 e de I-TAC em pacientes com FHD [113]. A quimiocina MCP-1/CCL2 foi encontrada em maiores níveis em pacientes com FHD em comparação à FD [114].

A falta de modelos animais que reproduzam a imunopatologia levou ao desenvolvimento de modelos *in vitro* utilizando linhagens humanas primárias, como monócitos e células dendríticas (DCs) diferenciadas e ainda linhagens endoteliais. Essas células são capazes de produzir citocinas e fatores solúveis quando infectadas pelo DENV. Chen e cols. observaram que monócitos infectados pelo DENV produzem TNF- α , IFN- α , IL-1 β , MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5, mas não IL-6 e IL-15 [115]. Já Bosch e cols. observaram aumento de ARN mensageiro de IL-6, IL8, IL-1 β e TNF- α e produção de IL-8 por monócitos e células endoteliais (HUVEC) [116]. Carr e cols. relataram que os sobrenadantes das culturas infectadas pelo DENV-2 induziram um aumento de permeabilidade nas culturas de HUVEC [117]. Segundo Espina e cols., o DENV-2 induz a apoptose nos monócitos infectados e a produção de TNF- α , mas não de óxido nítrico [118]. Nossa equipe observou que os monócitos infectados têm expressão aumentada da enzima óxido nítrico sintase, do receptor do tipo Toll (TLR)- 2, do fator tecidual [119] e é capaz de induzir a produção de TNF- α , IFN- α , IL-6 e IL-10 [120]. A infecção pelo DENV alteraria o padrão de resposta ao TNF- α dos macrófagos infectados, caracterizando um escape viral [121]. Recentemente, Kwan e cols. relataram que macrófagos dermais diferenciados *in vitro* não suportam a replicação do DENV, possivelmente pela produção de IL-10 por estas células [122].

Chaturvedi e cols. encontraram, em culturas de leucócitos de sangue periférico infectadas com o DENV, TNF- α , IL-2, IL-6 e IFN- γ precoce; e de IL-10, IL-5 e IL-4 em fase tardia, sugerindo que inicialmente a resposta ao vírus seria do tipo Th1, mudando para Th2 na fase tardia [123, 124]. Libraty e cols. demonstraram que as DCs infectadas com vírus DENV produzem níveis significantes de TNF- α e IFN- α , baixos níveis de IL-10 e produção de IL-12p70 quando adicionado IFN- γ nas culturas. As DCs infectadas exibiram reduzida expressão de marcadores de maturação quando comparado com as DCs não infectadas. Segundo os autores a gravidade resultaria da desregulação e exacerbação da resposta Th1 induzida por células T de memória fontes de IFN- γ [74, 125]. Já Ho e cols. descreveram a detecção de IL-2 e IFN- γ e de IL-4 e IL-10 em ensaios de co-culturas de linfócitos T e DCs infectadas, sugerindo que o DENV induza a produção de um perfil Th0 [126]. Medin e cols. observaram

a produção de IL-8/CXCL8, RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3 e MIP-1 β /CCL4 por DCs e pela linhagem de hepatócitos humanos (HepG2) ambos infectados [127]. Sanchez e cols. observaram que ambas populações de DCs – infectadas e não-infectadas – foram capazes de induzir a produção de TNF- α e IL-6 e exibiram aumento das moléculas de ativação CD80, CD86, CD40, CD83 e das moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe I [128]. Segundo Sun e cols., a adição de CD40L nas culturas de DCs infectadas aumentaria a infecção pelo DENV e a produção de IFN- γ por células T autólogas [129] e recentemente, a equipe demonstrou que DCs mielóides são mais permissivas a infecção pelo DENV do que DCs plasmacitóides. Porém DCs plasmacitóides sensibilizadas com DENV são rápidas produtoras de citocinas, em um mecanismo dependente de TLR-7 [130]. Luplertlop e cols. demonstraram a produção de metaloproteinases de matriz (MMP) por DCs infectadas [131] e por células endoteliais macrovasculares [132], correlacionando-as com o aumento da permeabilidade endotelial. Recentemente, Nightingale e cols. relataram que após exposição ao DENV, as DCs antígeno-positivas exibiram aumento de PD-L2 e MHC do tipo II e produção de TNF- α , enquanto as antígeno-negativas expressaram mais PD-L1, CD80, CD86 e MHC do I e produção de IP-10. Foi relatada a produção das quimiocinas IP-10, RANTES, MIP-1 α , MCP-1, não induzindo TGF- β , IL-10 e IL-12p70 [133].

Foi demonstrado *in vitro* que os interferons (IFNs)- α e - β tornam as células refratárias ao DENV quando administradas antes do inóculo viral [134]. Estudos demonstram que o DENV escapa do sistema imunológico através da inibição da via do IFN- α assim como outros flavivírus - JEV e HCV [135, 136]. O DENV inibe a ação do IFN- α e não do IFN- γ , através da diminuição da expressão do STAT-2 (*Signal transducer and activator of transcription*) [137, 138]. Munoz-Jordan e cols. demonstraram que a proteína não estrutural do DENV - NS4B - inibe a expressão dos ISREs (*interferon stimulated response elements*) e que a co-expressão de NS4A e NS4B aumenta essa inibição [41]. Através de microarranjos de DCs, monócitos, células endoteliais e células B infectadas pelo DENV *in vitro*, Warke e cols. indentificaram o aumento da expressão do gene *trail* (do inglês Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), sua possível ligação na via dos IFNs tipo I e II e mecanismos antivirais [139]. Tsai e cols. observaram numa linhagem monocítica humana (U937) transfectada com TLR-3, colocalização do receptor com partículas virais e produção de IL-8 dependente de TLR-3, sugerindo que este TLR poderia mediar a produção de IFN- α/β inibindo a replicação viral [140]. Wang e cols. observaram que DENV-2 foi capaz de induzir a produção de IFN- α por via dependente de TLR7 [141]. Chang e cols. relataram um aumento dos fatores de transcrição dos IFNs do tipo I: IRF-3; e IRF-1 e IRF-7 em células infectadas por vírus da encefalite japonesa (JEV) e DENV-2, respectivamente. Os flavivírus induzem o

aumento da expressão de IFN- β por via dependente de RIG-I/IRF-3 e PI3K/NF- κ B [142]. Recentemente, Loo e cols. observaram a ativação da via de reconhecimento por RIG-I e também de MDA-5 por WNV e DENV-2 [143].

Uma resposta de citocinas está claramente ligada com a ativação de células T e outros tipos celulares. De uma maneira geral, os números de células T CD4, T CD8, células NK (do inglês *Natural Killer*) e células T- $\gamma\delta$ se encontraram diminuídas na FHD em comparação a FD. [144]. Ainda, o aumento precoce nos números de células dendríticas plasmacitóides foi observado na FD sem complicações e os casos mais graves apresentaram uma resposta menos intensa dessa população celular [145]. Azeredo e cols. relataram células NK expressando precocemente marcadores de ativação, citotoxicidade e moléculas de adesão em pacientes com FD correlacionando com bom um prognóstico da doença [63]. Células NK do sangue são citotóxicas para células infectadas pelo DENV em órgãos alvos via citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC) [146].

Assim, é provável que a ADE, a replicação viral, a ativação de células T e a liberação de citocinas não sejam um processo linear, mas uma interação complexa de efeitos patológicos de retroalimentação positiva que se manifestam nas formas graves da FHD, no aumento da permeabilidade vascular e no colapso circulatório [147].

1.2. A Febre Amarela

A Febre Amarela é uma arbovirose causada pelo vírus da febre amarela (FAV), que pertence ao gênero *Flavivirus* e têm transmissão através do mosquito vetor *Aedes aegypti*, assim como o DENV. Ela foi considerada um dos maiores problemas de saúde pública causando epidemias desde o século XVII. A doença causa sintomas brandos sistêmicos, com recuperação na maioria dos casos. Apenas 15% dos pacientes entra na fase tóxica e desenvolve icterícia, sangramentos e problemas renais, sendo que metade desses casos graves é fatal. A zoonose é dificilmente erradicada em razão da existência de um ciclo silvático envolvendo primatas não-humanos e mosquitos. Não existem terapêuticos específicos para o tratamento dos pacientes infectados, porém a doença humana é prevenível mediante a vacinação com a amostra 17D do vírus amarelíco, conferindo imunidade duradoura de pelo menos 10 anos [6, 148, 149].

1.2.1. Histórico e Epidemiologia

O FAV tem suas origens no continente africano através de um ciclo silvestre entre primatas não-humanos e diversas espécies de mosquitos. O ciclo de transmissão urbana se iniciou de modo semelhante ao DENV com expansão das fronteiras peri-urbanas e vetoramento pelo mosquito *Aedes aegypti* [6].

A primeira grande epidemia nas Américas ocorreu em 1648 nas Ilhas do Caribe. A febre amarela foi considerada a maior doença epidêmica do Novo Mundo até o século XX. A última epidemia brasileira urbana foi registrada em 1942 em decorrência do sucesso do programa da OPAS de erradicação do vetor urbano *Aedes aegypti*. Atualmente a febre amarela é endêmica na África subsaariana e na América do Sul tropical. Entre 1990 e 2004 quase 15.000 casos humanos foram relatados à Organização Mundial de Saúde, 80% deles ocorreram na África. No período de 1980 e 2006, foram confirmados 662 casos de febre amarela silvestre, com 339 óbitos no país [150]. No período de janeiro de 2007 a janeiro de 2008, foram confirmados 226 casos de epizootia e 53 mortes de macacos; dos 20 casos humanos de febre amarela silvestre relatados, todos foram originados na região centro-oeste e com 50% de fatalidade [149]. Até fevereiro de 2009, 5 casos foram documentados, sendo 4 fatais no Rio Grande do Sul [151].

O FAV é transmitido aos humanos através de dois ciclos principais. No ciclo silvático, os primatas inferiores e os mosquitos vetores dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* mantem a circulação viral, sendo humanos com atividades ocupacionais nas regiões florestais

esporadicamente picados e contaminados. O ciclo urbano envolve a transmissão do FAV entre humanos e mosquitos do gênero *Aedes*, em áreas densamente populadas e atualmente não ocorre no Brasil [152, 153]. A diminuição da incidência da doença foi atingida pelo intenso controle de vetores e pela vacinação [148].

1.2.2. Manifestações Clínicas e Patogenia

Clinicamente, a febre amarela é uma síndrome hemorrágica, assim como a FD. As manifestações são caracterizadas por febre alta abrupta, cefaléia, dores musculares, náuseas, vômitos com progressão para incapacidade funcional do fígado, icterícia, falência renal, instabilidade cardiovascular, hemorragias, choque [152]. Aproximadamente 15% dos infectados apresenta a doença visceral e 50% dos hospitalizados vão ao óbito [154].

Assim, como a FD, existem evidências de que uma resposta inflamatória exacerbada poderia contribuir para os eventos terminais e a morte dos indivíduos infectados. Estudos indicam que as células de Kupffer (macrófagos residentes nos sinusóides hepáticos) são infectadas antes que os hepatócitos. Após a infecção por FAV, os tecidos linfóides se caracterizam pelo surgimento de grandes células mononucleares, a distensão dos folículos e a necrose dos centros germinativos (células B) [154]. As alterações hepáticas observadas nos casos fatais incluem degeneração hepática e das células de Kupffer e esteatose, principalmente na região central [155]. Os antígenos virais foram detectados em grande quantidade também na região central, enquanto que um infiltrado celular reduzido foi observado nas regiões centrais e periportais, com a presença de células de Kupfer, células NK, células dendríticas, células T CD4 e CD8, e células T ativadas CD45RO+. Algumas dessas células expressaram TNF- α e IFN- γ , porém a maior parte das células expressava TGF- β . Os hepatócitos centrais apresentaram maior reatividade ao ligante de FAS, uma molécula com funções apoptóticas [156, 157]. Quaresma e cols. sugerem que a necrose/apoptose na região central hepática seria um somatório do efeito citopático induzido pela replicação viral associado a potente resposta imunológica envolvendo as células T e as citocinas mencionadas acima [158]. Níveis séricos aumentados de IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, IL-1Ra e IL-10 foram observados em casos fatais de FAV em comparação aos não fatais [159].

1.2.3. Vacinas Contra Febre Amarela

As vacinas contra febre amarela estão disponíveis já há quase 70 anos e são responsáveis por uma significativa queda no número de ocorrências da doença no mundo todo.

Os esforços no desenvolvimento das vacinas começaram logo após o isolamento do vírus em 1927. A primeira delas foi desenvolvida pelo Instituto Pasteur (Dakar, Senegal) a partir de um vírus atenuado obtido através de propagação seriada por mais de 200 vezes, em cérebro de camundongo, gerando a cepa vacinal neurotrópica francesa. Mesmo sendo efetiva na prevenção da doença no continente africano durante a década de 30, seu uso foi descontinuado em razão da alta incidência de efeitos adversos como as encefalites [160].

Todas as vacinas atuais de febre amarela são derivadas da cepa 17D. Esta cepa foi obtida a partir do FAV patogênico isolado do africano Asibi, através de várias passagens em macacos rhesus, com períodos intermitentes em *Ae.aegypti*. Também foram feitas várias passagens em tecido embrionário de camundongo e em embrião de galinha [161]. Entretanto, as duas subcepas produzidas atualmente para vacinação no mundo são a 17D-204 e a 17DD (utilizada no Brasil). Diversas passagens em culturas foram realizadas para obtenção dessas vacinas, sendo que as melhores cepas são escolhidas baseadas na queda de víscero e neurotropismo do vírus, na baixa indução de efeitos adversos e nas altas taxas de soroconversão [162, 163].

Buscando os marcadores de atenuação, estudos no genoma das cepas vacinais realizados revelaram 48 sequências de nucleotídeos e 22 aminoácidos, espalhados nos genomas das cepas virais 17D-204 e 17DD, que diferem da cepa original Asibi. Provavelmente essas alterações estariam relacionadas com a atenuação viral [164]. Ainda foi relatado que a cepa 17DD teria uma N-glicosilação no resíduo 153 da proteína E do envelope viral, que a cepa 17D-204 não teria, refletindo as diferenças de 81 passagens a mais do vírus brasileiro 17DD [164].

No Brasil, o alto risco de ressurgimento da febre amarela urbana induziu um aumento da vacinação da população. Alguns casos de reações adversas descritos em 2001 questionaram a segurança da vacinação. Entretanto, data de 1975 a primeira fatalidade descrita como doença viscerotrópica aguda após vacinação contra febre amarela (YEL-AVD). Porém, não foram encontradas evidências fenotípicas para o aumento de virulência em modelo animal do vírus isolado, quando comparado com a cepa parental [165]. Galler e cols. isolaram as cepas virais de dois casos de óbito no Brasil, porém os testes de neurovirulência em macacos comprovaram o fenótipo atenuado em ambas as cepas [166]. Rodrigues e cols. compararam o vírus isolado do caso fatal com a cepa parental 17DD, revelando dados histopatológicos, viremia e resposta de anticorpos semelhantes [167].

Três explicações plausíveis sobre as YEL-AVD foram elaboradas. As vacinas poderiam ter sofrido mutações ou reversões para a forma virulenta; o receptor humano poderia ter uma suscetibilidade genética ou adquirida para o desenvolvimento da YEL-AVD; ou agentes

externos poderiam modular a resposta do receptor à vacinação [168]. Dados virológicos acumulados apresentaram heterogeneidade entre as cepas vacinais isoladas, mas não são evidências suficientes na correlação entre a YEL-AVD e a reversão da virulência [168]. Fatores como doenças relacionadas ao timo e idade dos imunizados foram apontados como fatores de risco para desenvolvimento de YEL-AVD [153]. Estudos realizados no Brasil estimaram a probabilidade do indivíduo adquirir reações adversas fatais ao ser imunizado numa faixa de 0,004 a 0,21 fatalidades por 100.000 doses, ou seja, um evento extremamente raro [169].

No mundo, a vacina contra a febre amarela é uma das mais efetivas, sendo a imunidade gerada em uma semana e em 95% dos vacinados. Usualmente, uma dose da vacina normalmente promove imunidade por 10 anos e provavelmente pela vida inteira [152]. Por essas boas características vacinais, a estabilidade e a segurança, o vírus FAVac 17D vem sendo utilizado como vetor para a expressão de antígenos heterólogos que podem levar ao desenvolvimento de novas vacinas vivas virais [170]. Barba-Spaeth e cols. demonstraram que um antígeno inserido no FAVac17D foi expresso em células dendríticas infectadas e capaz de estimular células autólogas CD8+. Esses dados indicam a capacidade do FAVac17D de carregar epítopos recombinantes no seu genoma, capazes de estimular a resposta imunológica [45].

A maior parte das quimeras construídas a partir do ADN (ácido desoxirribonucleico) circular do FAVac17D foi gerada utilizando proteínas recombinantes de outros flavivírus. Para o vírus da encefalite japonesa (JEV), foram inseridos epítopos de cepas atenuadas de JEV no esqueleto do FAVac 17D, gerando a ChimeriVax 17D/JE 14-14-2 [171]. Estudos de fase clínica II demonstram a indução de níveis de anticorpos neutralizantes após uma única dose nos indivíduos vacinados [172]. Uma quimera contra o vírus da encefalite de St. Louis (SLE) já foi construída, porém com fins de diagnóstico [173]. Para o vírus West Nile, a candidata a vacina ChimeriVax-WN demonstrou ser menos neurovirulenta e mais imunogênica em macacos rhesus que o FAVac17D [174].

Quimeras virais também foram desenvolvidas para o DENV. A primeira vacina a ser construída (Chimerivax-D2, Acambis/Aventis) utilizou os genes prM e E do DENV-2 que foram inseridos no ADN circular do FAVac 17D [175]. Também foram desenvolvidas quimeras vacinais para os outros sorotipos DENV-1, 3 e 4 [176]. Os testes clínicos fase I realizados para a Chimerivax-D2 exibiram resultados de imunogenicidade semelhantes ao FAVac17D [177]. As quimeras virais candidatas a vacina contra Dengue da Sanofi Pasteur foram recentemente submetidas a testes clínicos fase I, em que os resultados evidenciaram a segurança da vacinação em indivíduos flavivírus imunes ou não [178].

No Brasil, foram construídos vírus quimérico FAVac/DENV-2 por Caufour e cols. que também utilizaram o vírus 17D como vetor de expressão, sendo que os genes prM e E do vírus vacinal foram substituídos pelos mesmos genes de cepas dos vírus DENV-2. A quimera FAVac/DENV-2 44/3 utiliza os genes pr-M e E da cepa NGC (Nova Guinéia C), sendo que o final carboxílico da proteína E (aminoácidos E261-E495) pertencem a cepa brasileira 44/2. A cepa NGC pertence ao genótipo asiático e a cepa 44/2 foi isolada de um paciente que foi ao óbito causado por FHD, pelo laboratório da Dra. Rita Nogueira (IOC/FIOCRUZ). Foram obtidos bons resultados de imunização desta quimera: 85% de camundongos vacinados sobreviveram desafio ao DENV-2 NGC [179] e 6 de 7 macacos rhesus imunizados desenvolveram anticorpos neutralizantes contra DENV-2, sobrevivendo ao desafio com DENV-2 44/2 [180]. Mais recentemente a equipe brasileira relatou a construção de um vírus quimera FAVac/DENV-1, mais atenuado que o FAVac17DD em macacos rhesus, podendo ser um candidato potencial à formulação tetravalente da vacina contra o DENV [181].

1.2.4. Mecanismos de Ação das Vacinas 17D

O potencial das vacinas para febre amarela em gerar uma imunidade duradoura vem levantando questões sobre quais seriam os mecanismos imunológicos de ação desse vírus. Santos e cols. relataram um aumento na frequência de células T CD4+ e CD8+ em primo-vacinados, assim como de células B [182]. Também em primo-vacinados, Martins e cols. apontaram, no dia sete após a vacinação, um aumento de células CD8+CD69+ e também de CD4+HLA-DR+, sugerindo a existência de cinéticas distintas de ativação celular para cada subtipo de célula T [183]. Foi observado um aumento na frequência das populações de monócitos CD14+CD16+ e de células pré-NK; e um aumento na ativação de neutrófilos e eosinófilos. As populações monocíticas expressaram um padrão misto de receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2, e um aumento da expressão de FcγR (receptor para porção Fc do tipo gama) enquanto neutrófilos exibiram CXCR4 e receptor de IL-10. Segundo os autores, a vacinação com o vírus FAVac 17DD induz uma resposta celular do tipo 1 modulada [184]. Querec e cols. demonstraram que a vacinação induz aumento na expressão de genes reguladores do reconhecimento viral como TLR7, RIG-I e MDA-5, além de genes relacionados a via dos IFNs tipo I. Níveis de IP-10 e IL-1α foram detectáveis no soro dos primo-vacinados [185].

Ensaios *in vitro* demonstraram que o FAVac 17D é capaz de infectar células dendríticas humanas derivadas de monócitos tanto na forma madura quanto imatura [45, 186]. Entretanto, ao contrário do DENV, a entrada do vírus nas DCs é independente do receptor DC-SIGN

[187], mas é cálcio dependente [45]. Palmer e cols. demonstraram um aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e de MHC classe II estimuladas pelo YF17D e sugerindo que o vírus estaria ativando potentemente as DCs infectadas, o que é necessário para a estimulação eficiente das células T autólogas [187]. Querec e cols observaram que o reconhecimento do FAVac17D por DCs murinas se daria através dos TLR 2, 7, 8 e 9. As DCs humanas infectadas foram capazes de produzir IL-6, IL-10, MCP-1, IP-10 e DCs plasmacitóides induziram altas concentrações de IFN- α [188]. Deauvieu e cols. também observaram produção de IL-6, IFN- β e MCP-1 pelas DCs infectadas [189].

1.3. As Células Dendríticas

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos (APCs) que compreendem menos de 1% do número total de células do sangue periférico [190] e são fundamentais na ligação entre a resposta imunológica inata e adaptativa. As DCs reconhecem e processam os antígeno e apresentam às células T, auxiliando o desencadeamento da resposta frente ao antígeno: tolerância ou imunidade [191].

1.3.1. Populações de Células Dendríticas Humanas

As DCs constituem um grupo heterogêneo de células localizadas em vários órgãos, originadas de uma linhagem distinta no desenvolvimento dos leucócitos. Uma das particularidades constatadas na geração de DCs é a plasticidade de sua formação, sendo as células originadas através de precursores mielóides e linfóides. Células pluripotentes CD34+ que expressam FLT3 (tirosina quinase 3 relacionada ao FMS) localizadas na medula óssea podem ser consideradas as precursoras das DCs, que durante a diferenciação em suas subpopulações, migram para a corrente sanguínea e se alojam em órgãos específicos [192, 193].

As subpopulações de células dendríticas são classificadas de acordo com localização anatômica, expressão de moléculas de superfície e função no sistema imunológico [194]. Atualmente, as DCs são agrupadas em DCs convencionais (cDCs) e DCs plasmacitóides (*plasmacytoid dendritic cells* – pDCs) [195]. Em geral, podemos classificar as cDCs em migratórias ou residentes em tecidos linfóides. As cDCs migratórias capturam antígenos na periferia, migram via linfáticos para os linfonodos, onde os antígenos são apresentados às células T. Exemplificam as cDCs migratórias, as células dendríticas encontradas na epiderme e nos epitélios intestinal, respiratório e reprodutivo, chamadas de células de Langerhans (*Langerhans cells* – LCs), e as DCs intersticiais e dermais, encontradas na derme. As cDCs residentes nos tecidos linfóides possuem funções restritas ao órgão residente, pois os antígenos coletados no órgão, são apresentados no mesmo local, como por exemplo as DCs encontradas no timo e no baço [196]. As DCs plasmacitoides são caracterizadas pela ausência de marcadores mielóides, sugerindo a origem linfoide desse subtipo. As pDCs recirculam continuamente entre a corrente sanguínea e os órgãos linfóides, através das veias de endotélio alto, podendo assim serem encontradas nas zonas T dos órgãos linfóides, no timo e no sangue [194]. Essas células têm capacidade de produzir enormes quantidades de IFN- α quando estimuladas por uma infecção viral [197].

1.3.2. Captura de Antígenos pelas Células Dendríticas

As DCs estão presentes na maioria dos tecidos em uma fase de diferenciação chamada “imatura”. As DCs imaturas (imDCs) são caracterizadas por intensa atividade endocítica e capturam vários tipos de antígenos como: patógenos, células infectadas, células mortas e seus produtos através de fagocitose, micropinocitose e endocitose mediada por receptores [198]. As vesículas de micropinocitose são grandes endossomos formados pelo fechamento dos lamelipodia e permitem contato contínuo das imDCs com o conteúdo do líquido extracelular. A endocitose mediada por receptores internaliza antígenos através da ligação dos mesmos com várias moléculas presentes na superfície das imDCs [199].

Existe uma grande variedade de receptores endocíticos descritos em DCs. Os imunocomplexos são capturados por receptores para porção Fc das imunoglobulinas: Fc α R (CD89), Fc ϵ RIeII (CD23) e Fc γ RI (CD64), RII(CD32) e RIII (CD16) [199, 200]. Os receptores para carboidratos (lecitinas do tipo C) relatados nas DCs são receptor de manose (MR, CD206), receptor de manose para macrófago DEC-205 (CD205), DC-SIGN (CD209), BDCA-2, DECTIN-1, DCIR, DCAL-1 e C-LEC [199].

Além dos receptores endocíticos, participam no reconhecimento de patógenos os receptores de padrões moleculares (*pattern recognition receptors* – PRRs). A família de PRRs melhor caracterizada é a dos receptores do tipo toll (TLRs) que reconhecem os padrões moleculares em lipídeos, carboidratos, peptídeos e estruturas relacionadas com ácidos nucleicos amplamente expressos em diferentes grupos de microorganismos, como lipoproteínas de procariotos, glicolipídeos, flagelina, CpG ADN e lipossacarídeos [201]. Em DCs, foram encontrados TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR8 e TLR9 [202]. A família das helicases similares a RIG-I consiste em PRRs intracelulares detectores de ARN citoplasmáticos. As DCs apresentam, por exemplo, a expressão de RIG-I e MDA5 que ativados induzem a produção de IFN- α/β [203].

A distribuição dos TLRs varia de acordo com a população de DCs, permitindo respostas especializadas de acordo com o patógeno. Por exemplo, as DCs plasmacitoides expressam TLR7 e TLR9 e a ativação dessas vias por produtos virais induz altos níveis de IFN- α /IFN- β pelas células. Entretanto, as pDCs não expressam TLR4, o que limita a sua resposta ao LPS [204]. Além da distribuição diferencial, o reconhecimento de um patógeno por vários tipos de PRRs na mesma célula contribui para a qualidade da resposta gerada [205].

Os antígenos endocitados se ligam às moléculas de MHC, levando ao início do processo de maturação das DCs, transformando-as assim em células próprias para apresentação dos

antígenos fagocitados às células T [206]. A maturação, segundo Steinman e cols. é um complexo processo de diferenciação iniciado principalmente por patógenos e citocinas inflamatórias, em que as DCs tornam-se capazes de ativar células T virgens [193].

1.3.3. Maturação e Migração de Células Dendríticas

Durante o processo de maturação das DCs, a capacidade de captura e processamento de antígenos é reduzida, propiciando a restrição de apresentação de peptídeos endocitados na periferia. Ocorre um aumento de expressão de moléculas MHC classe I e classe II na superfície celular e também de moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86, CD83, CD40, CD38 e OX40L. Várias moléculas de adesão também são expressas como CD2, CD11a, CD54 e CD58, além das integrinas β_1 e β_2 [204, 206]. Apesar do papel endocítico, o DC-SIGN ainda é expresso nas DCs maduras, pois é fundamental no primeiro contato e na ligação entre as DCs e células T, durante a sinapse imunológica, ou seja, na estimulação antígeno-específica [207].

As DCs imaturas expressam receptores de quimiocinas que as atraem para os tecidos periféricos, como o CCR6, CCR1, CCR2 e CCR5 [194]. No processo de maturação, as células passam a expressar o CCR7 e adquirem a capacidade de responder ao CCL21 (SLC) e ao CCL19 (MIP-3 β), entre outros receptores de quimiocinas linfoides, que são produzidas por células dendríticas interdigitais e células estromais do linfonodo e pelo endotélio linfático [208]. A sensitização de CCR7 aos seus ligantes é dependente de outros dois fatores: a prostaglandina E2 e a molécula CD38. Além de ser considerada uma molécula de maturação inicial, o CD38 é uma enzima que participa na quimiotaxia através da mobilização de cálcio intracelular via geração de adenosina difosfato ribose cíclica [209]. A ligação de CD38 com a molécula CD31 expressa em células endoteliais, também contribui para a migração das DCs [210]. Sendo assim, as DCs ativadas passam a migrar através da corrente linfática para os linfonodos proximais e entram na área paracortical, onde efetuam contato com as células T [204].

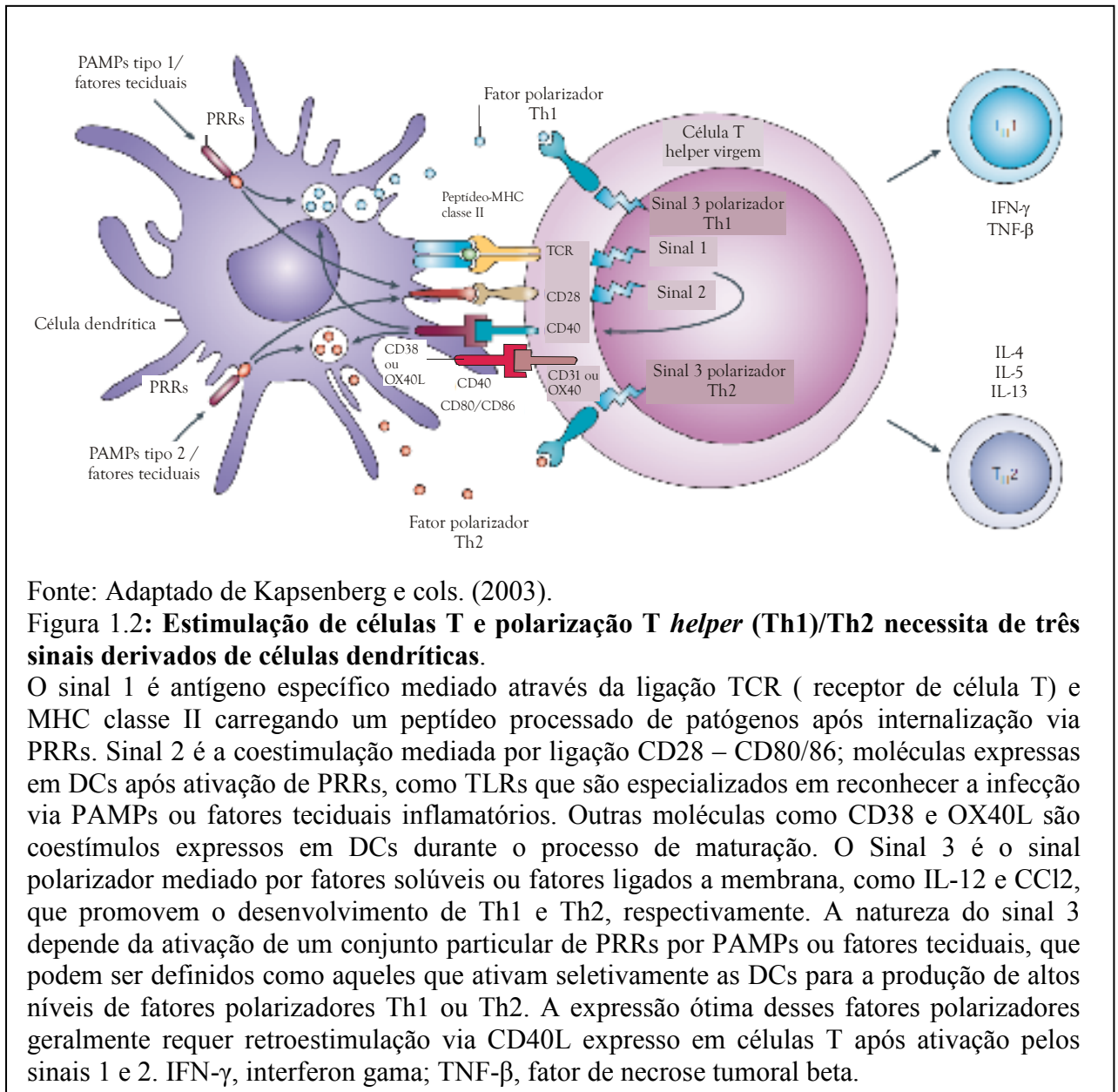
1.3.4. Interação entre as Células Dendríticas e as Células T

A aquisição de um perfil específico pelas populações de imDCs na transição para um estado “efetor”, em resposta aos sinais de origem exógena (como microorganismos) ou endógena (como citocinas, hormônios e células mortas), determinam a qualidade da resposta a induzida por estas DCs [211]. As células dendríticas maduras ativam as células T virgens (Figura 1.2) através de três tipos de sinalização, na chamada sinapse imunológica: 1) ligação do MHC – peptídeo com o TCR (receptor de célula T); 2) ligação entre as moléculas coestimulatórias expressas nas células; e 3) reconhecimento das citocinas presentes no ambiente. A interação desses três sinais definirá a diferenciação, e consequentemente o fenótipo das células T [207]

O tempo de interação entre as DCs e as células T pode ser um fator crucial na definição do perfil funcional das células T, ou seja, se serão células anérgicas, efetoras ou células de memória. De acordo com Lanzavecchia e Sallusto, o contato prolongado com alta expressão de antígenos e moléculas coestimulatórias pelas DCs, na presença de citocinas, geraria células T efetoras; o contato de curta duração com expressão de antígenos e moléculas coestimulatórias geraria células de memória; e o contato de curta duração de DCs expressando baixas quantidades de antígenos e de moléculas coestimulatórias geraria células tolerantes [212].

As moléculas co-estimulatórias podem colaborar para a polarização de células T efetoras, com relação ao perfil T *helper* (Th) 1 e 2. A molécula CD38 está envolvida na resposta Th1 em DCs com maturação induzida por LPS. Frasca e cols. relataram que a inibição da sinalização de CD38, durante o processo de maturação induzido por LPS, afeta a produção de IFN- γ por células T autólogas em co-cultura. O bloqueio de CD38 inibe a produção de IL-12p70, responsável pela polarização de células Th1, e a reativação da sinalização de CD38 restaura a produção de IL-12 [210].

Evidências crescentes indicam que o receptor OX40L expresso em células dendríticas [213] pode contribuir para a polarização Th2. A ligação de OX40L de DCs com seu cognato em células T OX40 aumentou a expressão de IL-4 ARN mensageiro pelas células T ativadas [214], e também a produção de IL-13, suprimindo a produção de IFN- γ [215]. Ito e cols. observaram que DCs ativadas por linfopoetina estromal tímica (TSLP) expressam OX40L induzindo produção de citocinas Th2 (IL-4, IL-13, IL-5) em células T autólogas e de TNF- α , inibindo a produção de IL-10 [216]. Recentemente, foi observada a necessidade da coestimulação via OX40 para indução ótima de células Th2 efetoras e de memória *in vivo* [217].



Os principais sinais indutores da transformação das imDC em DCs “efetoras” são o perfil de citocinas encontrada no local do estímulo e a ativação de receptores de reconhecimento de patógeno. Esses fatores determinam o perfil funcional das células dendríticas durante a ativação de células T, principalmente qual será o perfil de produção de citocinas por essas DCs maduras [211].

1.3.5. As Células Dendríticas e as Citocinas

O reconhecimento dos microrganismos pelas células da imunidade inata estimula a ativação dos receptores TLRs através de diferentes vias de transdução de sinal. Os TLR induzem produção de citocinas pela ativação dos fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 e IRFs. As moléculas adaptadoras MyD88 (*myeloid differentiation primary-response gene 88*) e TRIF (*Toll/IL-1R(TIR) domain-containing adaptor protein inducing interferon- β*) são necessárias para desencadear a transdução de sinais intracelulares. Os receptores TLRs 2 e 4 necessitam das moléculas auxiliares TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) para ativação de MyD88 e TRIF, respectivamente [218]. Os TLRs que classicamente reconhecem padrões moleculares virais são TLRs 3, 7, 8 e 9 e ficam localizados nos compartimentos endossomais, reconhecendo os patógenos após a endocitose. Através da ativação de MyD88 (TLR 7, 8 e 9) ou de TRIF (TLR3), são induzidas a translocação de NF- κ B e IRF7 para o núcleo, com a transcrição dos genes de citocinas pró-inflamatórias e antivirais [219].

A complexidade da interação das diferentes moléculas adaptadoras em cada via TLR e a ativação de múltiplos TLRs por um patógeno contribuem para a geração da resposta à infecção. A indução de vários receptores poderia aumentar uma única função efetora da célula estimulada ou coordenar a indução de respostas distintas [218].

Uma das vias de sinalização que teria papel na transdução dos sinais dos TLR na polarização das respostas Th (*T helper*) é a cascata das MAPK. Nas células de mamíferos, essas moléculas são representadas por três grandes grupos: as ERK (*extracellular signal-regulated protein*), a MAPK p38 e as JNK (*c-Jun NH₂-terminal kinase*). Os agonistas de TLRs instruíam as DCs humanas sobre qual tipo de perfil de citocinas será produzido e, assim, qual o perfil efetor que essas células vão adquirir, pela modulação diferencial dos componentes da via de sinalização das MAPK [220]. Vários trabalhos recentes vieram comprovar essas afirmativas, Agrawal e cols. demonstraram que LPS e flagelina induzem as DCs a estimular uma resposta Th1 via produção de IL-12p70, que depende da fosforilação de p38 e JNK 1/2 MAPK. Em oposição, o agonista de TLR2, Pam3cys (*Pam3Cys-Ser-Lys4*) e

ovos de *Schistosoma mansoni* (indutor de resposta Th2) tem baixa indução de IL-12, mantém a fosforilação de ERK1/2, direcionando para uma resposta Th2 [221]. Yi e cols. demonstraram que ERK e p38 regulam diferentemente a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em DCs ativadas por ADN CpG, sendo que a ERK seria responsável pela indução de IL-10 [222].

Sendo assim, dentre as citocinas produzidas pela interação patógenos-DCs e moduladas pelas vias citadas acima, estão:

TNF- α – É considerado uma citocina multifuncional e o mais importante mediador inflamatório. O TNF- α exerce funções diversas como aumentar a habilidade fagocítica de macrófagos, induzir a maturação de células dendríticas, induzir a expressão de moléculas de adesão e o aumento da permeabilidade no endotélio, propiciando o aumento do número de células mononucleadas no local da inflamação [223, 224]. Juntamente com a IL-1 e a IL-6, o TNF- α age no hipotálamo para a indução da febre [225]. A sinalização do TNF- α é realizada principalmente através de receptores de superfície TNFR1 e TNFR2 que ativam os fatores de transcrição nucleares NF- κ B e AP-1, os promotores de inúmeros genes pró-inflamatórios [226]. Além de induzir as vias de produção dos reativos do oxigênio, a ligação do TNF- α aos seus receptores pode ativar a via das caspases e desencadear o processo de apoptose celular [227]. A sua potente ação biológica propicia intensa lesão tecidual, quando liberado sistemicamente em altas concentrações, podendo ser o responsável pelos quadros de hipotensão, supressão do miocárdio, extravasamento plasmático e estimulação de cascatas de coagulação em condições patológicas como na sepses bacteriana e na FD [97, 228].

IL-6 – Considerada uma citocina pleiotrópica com inúmeras atividades biológicas, podendo ser produzida por células linfóides e não linfóides. A IL-6 auxilia na regulação da reatividade imunológica, na resposta de fase aguda, na inflamação, na oncogênese e na hematopoiese. Ao se ligar ao seu receptor, a IL-6 ativa o complexo JAK-STAT (do inglês *Janus Kinase – Signal transducer and Activator of Transcription*) que promove transcrição de proteínas de fase aguda e citocinas pró-inflamatórias. A produção de IL-6 é estimulada por TNF- α e IL-1 β e persiste por mais tempo no plasma do que estas citocinas pró-inflamatórias. Níveis plasmáticos de IL-6 foram correlacionados com mortalidade no choque séptico [229]. Recentemente, observou-se a participação de IL-6 na diferenciação do subtipo Th17 de células T com funções pró-inflamatórias [230].

IFN- α . – É uma citocina anti-viral produzida em grandes quantidades principalmente pelas DCs plasmacitóides mediante a infecção viral. Através da ligação com seu receptor na célula, ativa as vias do JAK-STAT, que induzem a expressão dos genes ISGs (*Interferon-Stimulated Genes*) através da ativação de seu fator de transcrição, o IRF7. Dentre as funções

dos ISGs, pode-se destacar a interferência na tradução e edição do RNA mensageiro viral e, ainda, a ação enzimática direta sobre este RNA [231]. O IFN- α é um diferenciador do desenvolvimento das repostas do tipo Th1 (do inglês *T helper*) e da imunidade celular, principalmente da ativação de células NK [232].

IL-1 e IL-1Ra – A família dessas citocinas está relacionada com a inflamação e defesa frente infecção. A IL-1 é uma citocina pró-inflamatória e pode ativar células dendríticas. A IL-1Ra é o receptor antagonista de IL-1, que inibe a atividade biológica de IL-1 através de competição pelo receptor de IL-1. A inflamação sistêmica induz a produção desse receptor solúvel, pois a IL-1Ra atua como anti-inflamatório não-esteróide [233]. O desequilíbrio entre IL-1 e IL-1Ra tem papel fundamental no desenvolvimento de artrites e a IL-1Ra está envolvida no controle da resposta Th1 e Th17 [234].

IL-10 – É considerada uma citocina moduladora da resposta imunológica. A IL-10 diminui a expressão dos marcadores de maturação das DCs, diminuindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-12; e a expressão de moléculas co-estimulatórias [204]. Além disso, DCs produtoras de IL-10 podem induzir a diferenciação de linfócitos T virgens em células T regulatórias 1. Essas células participam na imunomodulação da resposta imunológica Th1 e Th2, inibindo as células T ativadas através da secreção de IL-10 ou através de mecanismos de contato célula a célula [235, 236]. A produção de IL-10 é induzida durante respostas inflamatórias por TNF- α e IL-1 β , o que sugere a existência de uma retroalimentação negativa entre essas citocinas. Nos quadros de sepsis, as altas concentrações das citocinas pró-inflamatórias no início da doença induzem um perfil de citocinas imunossupressor durante o desenvolvimento da doença. Não se sabe ao certo se a IL-10 produzida seria um mecanismo compensatório ou imunopatológico, apesar da função modulatória na produção de TNF- α , fundamental na patogênese do choque séptico [237].

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que direcionam o fluxo celular de maneira homeostática ou induzida, mediante a ligação com seus receptores expressos em vários tipos celulares. Os receptores de quimiocinas são acoplados a proteínas G e quando ativados desencadeiam um aumento intracelular de cálcio. Foram identificadas quatro famílias de receptores classificadas de acordo com o posicionamento de resíduos de cisteína: CXC, CC, CX3C e XC, que em geral interagem de maneira promíscua com as quimiocinas pertencentes ao mesmo perfil de subfamílias [238].

Como citado anteriormente, as DCs mudam o perfil de produção desses mediadores e expressão de seus receptores durante o processo de maturação. As quimiocinas são necessárias para atrair monócitos, células dendríticas imaturas, neutrófilos e células NK para o local da inflamação, direcionar as APCs para os vasos linfáticos e aproximar DCs e células

T nos órgãos linfáticos. As quimiocinas inflamatórias se ligam a mais de um receptor e o processo de quimiotaxia é dependente dessa ligação através de um gradiente de concentração. As quimiocinas são induzidas de maneira diferencial em resposta à diferentes patógenos ou tipos de estímulos.[239].

Durante o processo de infecção viral aguda, as quimiocinas CCL2/MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), CCL3/MIP-1 α (*macrophage inhibitory protein-1*), CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) e CXCL3/IP-10 (*interferon-inducible protein 10*) são preferencialmente detectadas independente do vírus, local do órgão ou fase da infecção [240]. Essas quimiocinas inflamatórias são produzidas por vários tipos celulares como monócitos, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos. CCL3 e CCL4 atraem neutrófilos para o local da inflamação pela ligação ao CCR1, enquanto monócitos e DCs imaturas são atraídos por CCL2-5 através da ligação a CCR1, CCR2 (CCL2) e CCR5 (CCL3-5). As células NK migram em resposta a CXCL9-11 pela ligação ao receptor CXCR3, que também promove desgranulação de fatores citotóxicos. Quando ativadas, as células NK aumentam expressão de CCR2 e respondem também a CCL2 [238].

Foi sugerido que algumas quimiocinas poderiam influenciar na polarização de células T. A exposição de células dendríticas maduras aos ligantes de CCR5 pode transformá-las em DCs indutoras de células Th1 [241]. Os ligantes de CCR5 teriam função similar a IL-12, IL-23 e IL-27 em promover a resposta Th1. Ensaios *in vitro* com DCs humanas derivadas de macrófagos foram capazes de produzir altas concentrações de CCL3-5 e promover o desenvolvimento de células T produtoras de IFN- γ independente de IL-12 [242]. Entretanto, a quimiocina CCL2 teria homologia com IL-4 ou IL-10 em relação a polarização Th2 [243]. Estudos *in vivo* demonstraram que neutralização de CCL2 levou a um aumento de produção de IL-12 por macrófagos associados a granuloma e adição de CCL2 à culturas de macrófagos *in vitro* causou diminuição de expressão de IL-12 [244, 245]. Entretanto, DCs geradas *in vitro* foram resistentes a supressão de IL-12 por CCL2 [246], sugerindo que a função de CCL2 seja dependente do contexto da resposta imunológica [245].

A expressão diferencial de receptores de quimiocina em células T *helper* polarizadas indica o papel diferencial dessas quimiocinas citadas também no recrutamento celular seletivo. As quimiocinas CCL1, CCL11, CCL17 e CCL22 atraem linfócitos Th2. Essa quimiotaxia é mediada primariamente pela expressão de CCR4 e CCR8 em células Th2, e também por CCR3 em células altamente polarizadas. Os receptores CCR5 e CXCR3 são preferencialmente expressos em células Th1 produtoras de IFN- γ , e como consequência, migram em resposta a CCL3-5 e CXCL10, respectivamente [238, 239].

1.3.6. As Células Dendríticas nas Infecções Virais

A disposição das DCs nos tecidos determina que sejam, na maioria das vezes, as primeiras células do sistema imunológico encontradas pelos patógenos. Sendo assim, as DCs são objeto dos inúmeros mecanismos usados pelos vírus para inibir, bloquear ou evadir as defesas do organismo [247].

Raftery e colaboradores descreveram que DCs derivadas de monócitos são infectadas por Hantavírus. As DCs infectadas exibiram aumento na expressão de MHC do tipo I, na expressão de moléculas coestimulatórias e de moléculas de adesão, ou seja, o Hantavírus não inibiu a maturação e a apoptose celular. Além disso, o vírus foi capaz de induzir níveis significativos de TNF- α e de IFN- α [248]. Níveis significantes de citocinas pró-inflamatórias foram encontrados em pacientes com a síndrome renal por Hantavírus [249-251], corroborando a hipótese de que, assim como o Dengue, a imunopatologia tem papel fundamental na febre hemorrágica por Hantavírus, sendo as células produtoras de citocinas pró-inflamatórias de fundamental importância para o estabelecimento do quadro patológico [248].

O vírus Ebola pode inibir a produção e a resposta ao IFN- α/β exógeno em macrófagos. DCs infectadas secretam algumas quimiocinas, falham na expressão de moléculas coestimulatórias e de MHC, e não são capazes de induzir diferenciação de linfócitos alogênicos [252]. Os vírus Marburg são capazes de infectar MDSCs, porém não induzem produção de citocinas, principalmente do IFN- α , e induzem maturação anormal [253].

O receptor DC-SIGN é frequentemente utilizado por vírus para escapar da vigilância imunológica exercida pelas DCs, sendo que certos vírus como o Ebola, o vírus da imunodeficiência dos símios (SIV), o citomegalovírus (CMV), o HIV e o vírus da hepatite C (HCV) são exemplos desses patógenos [254]. Os vírus HIV e HCV subvertem a função do DC-SIGN de reconhecimento e endocitose mediada por receptor, através da fuga da degradação pelo pH ácido típico dos lisossomos, facilitando a disseminação viral e transmissão às células alvo, hepatócitos, no caso do HCV [255], e linfócitos T CD4, no caso do HIV [256].

Como dito anteriormente, as DCs são alvos para o vírus DENV e o FAVac é capaz de replicar nessas células. Wu e colaboradores demonstraram que imDCs são permissivas à replicação viral pelo DENV [59]. Já o FAVac é capaz de infectar essas células na forma madura e imatura [45, 186]. Ho e colaboradores relataram que a infecção pelos quatro sorotipos induz a maturação das DCs [257] e vários grupos detectaram a produção de TNF- α ,

IFN- α dentre outras citocinas pelas DCs infectadas [74, 257, 258]. Palmer e cols. (2007) demonstraram que o FAVac está ativando potentemente as DCs infectadas [187] e o mesmo autor (2005) observou uma modulação da ativação das DCs infectadas pelo DENV-2 [258].

Assim, foi relatado que as citocinas têm um papel fundamental na imunopatologia da FD e também teriam papel crucial na determinação da imunidade duradoura na vacinação com o vírus da Febre Amarela Vacinal. Entretanto, ambos mecanismos imunológicos não são completamente conhecidos. Estudar a produção de citocinas e a expressão das moléculas de maturação dessas células dendríticas infectadas gera um maior entendimento de como essas respostas patogênica e vacinal são moduladas. A comparação entre as respostas poderá originar alvos para futuros terapêuticos para a FD, contribuindo com novas informações sobre o mecanismo vacinal do FAVac. Ainda, este estudo pode indicar um possível perfil imunológico protetor que poderá ser utilizado nos testes com vacinas brasileiras contra o DENV, uma vez que a infecção e ativação de DCs por vírus atenuados provavelmente contribui para a eficácia das vacinas em humanos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi estudar a resposta de células dendríticas *in vitro* induzida por dois flavivírus. Foram selecionados um patogênico, o vírus Dengue-2 cepa asiática, e um vírus indutor de resposta protetora, o vírus Febre Amarela Vacinal e estudadas suas características de infecção em células dendríticas humanas, determinando as taxas de replicação intracelular viral, a expressão de moléculas de ativação e a indução de um perfil de citocinas, realizando análises comparativas entre eles quando possível.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as taxas de infecção de duas cepas virais – uma de DENV-2 e outra de FAV vacinal - após a infecção de células dendríticas derivadas de monócitos humanos;
- Determinar a expressão das moléculas de ativação CD38 e OX40L após a infecção de células dendríticas;
- Determinar a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, antiviral IFN- α , anti-inflamatórias IL-1ra e IL-10 e das quimiocinas CCL4/MIP-1 β , MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5 nos sobrenadantes das culturas de células dendríticas derivadas de monócitos induzidas pelas cepas virais;
- Comparar as respostas dos dois flavivírus estudados para os diferentes parâmetros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cepas virais

A cepa de DENV-2 utilizada é a cepa asiática padrão internacional (16681) originalmente pelo Dr. Halstead do Instituto Militar de Pesquisa Walter Reed, Maryland/EUA [259]. Essa cepa viral é a cepa padrão DENV em nosso laboratório e já foi utilizada para a padronização dos ensaios de infecção em monócitos [57, 120], tendo demonstrado bons resultados de replicação intracelular.

A cepa de FAVac utilizada é a atual vacina de Biomanguinhos/FIOCRUZ, disponível no Brasil contra a febre amarela – 17DD [162]. Esse vírus foi cedido pelo Laboratório de Tecnologia Viroológica – LATEV/Biomanguinhos com a colaboração do Dr. Marcos Freire.

3.2. Produção e titulação das massas virais

3.2.1. Meio de cultura e cultivo de células Vero

As células Vero (ATCC CCL81) foram mantidas pela equipe do Dr. Marcos Freire (LATEV). O protocolo que se segue foi utilizado para o cultivo. As células Vero foram cultivadas em garrafas de cultura de 175 cm² com 80 mL de meio 199 Earle's suplementadas com 1% gentamicina; 5% bicarbonato de sódio (7,5% p/v); e 5% de SFB. As garrafas foram incubadas em estufa 37°C/5% CO₂ até a formação de monocamada confluenta. Em seguida foram utilizadas para titulação e produção das massas virais.

3.2.2. Produção do estoque viral

Garrafas de 175 cm² de cultura de células Vero contendo 5 x 10⁵ células/mL foram inoculadas com as cepas virais. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 3 mL do inóculo viral com diluição 1/5. Após 90 min de adsorção viral, o inóculo foi retirado e foram adicionados 80 mL de meio Dubelcco's suplementado com 2% de SFB. As garrafas foram incubadas em estufa 37°C/5% CO₂ por 7 dias, quando foi detectada a presença do CPE. O sobrenadante foi centrifugado a 1500 RPM por 10 min (Cientec CT-6000), aliqotado e armazenado com 30% de SFB a -70°C para posterior titulação.

O vírus DENV-2 16681 utilizado nos experimentos tem 3 passagens em células vero e o vírus FAVac 17DD tem 2 passagens em células Vero.

3.3. Titulação viral por ensaio de diluição seriada

A titulação dos vírus crescidos em células Vero foi realizada através de imunofluorescência indireta e calculada de acordo com Reed & Muench [260]. Em placas de 96 poços fundo chato, foi adicionado 0,2 mL de suspensão contendo 5×10^5 células/mL em meio 199 suplementado com 10% de SFB. A placa foi incubada em estufa 37°C até o fechamento da monocamada. O sobrenadante foi retirado e adicionado 0,05 mL de inóculo viral com diferentes diluições (10^{-1} a 10^{-11}). Para cada diluição foi feita uma quadruplicata de poços, além de quatro poços controle. A adsorção viral foi feita por 90 min em estufa 37°C e após incubação, o sobrenadante foi retirado e 0,2 mL de meio Eagle Earle suplementado com 2% de SFB foi adicionado. A cultura foi mantida por um período de 7 dias em estufa 37°C/5%CO₂, com observação diária para visualização do efeito citopático. Após esse período foram retirados 0,1 mL de sobrenadante, sendo a cultura celular ressuspensa no meio restante com auxílio de uma ponteira plástica.

A suspensão celular (0,025 mL) é colocada em lâminas de imunofluorescência previamente lavadas. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram rinsadas com tampão fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Saline* – PBS) e fixadas com acetona P.A. por 20 min a 4°C. Foram adicionados em cada orifício das lâminas 0,02 mL de anticorpo primário anti-DENV diluído 1/100 ou anti-FA diluído 1/200 em solução de lavagem I, seguindo de incubação por 60 min em câmara úmida e estufa 37°C. Foram feitas duas lavagens com PBS 1x por 10 min. Após secagem a temperatura ambiente, foram adicionados em cada orifício 0,02 mL de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo FITC diluído 1/25 em solução de lavagem I, seguindo de incubação por 30 min em câmara úmida e estufa 37°C. As lâminas foram lavadas duas vezes em PBS 1x por 10 min e rinsadas com água destilada. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com glicerol. A leitura foi realizada imediatamente em microscópio óptico de fluorescência no filtro azul para fluoresceína. Através da fórmula de Reed & Muench, o título foi obtido em TCID₅₀ /mL (do inglês *50% tissue culture infective dose*).

DENV-2 16681

Diluição	# poços positivos	# poços negativos	Total positivo	Total negativo	Razão	%
10 ⁻¹	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻²	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻³	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻⁴	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻⁵	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻⁶	2	2	2	2	2/4	50
10 ⁻⁷	0	4	0	4	0/4	0
10 ⁻⁸	0	4	0	4	0/4	0
10 ⁻⁹	0	4	0	4	0/4	0
10 ⁻¹⁰	0	4	0	4	0/4	0
10 ⁻¹¹	0	4	0	8	0/4	0

FAVac 17DD

Diluição	# poços positivos	# poços negativos	Total positivo	Total negativo	Razão	%
10 ⁻¹	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻²	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻³	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻⁴	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻⁵	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻⁶	4	0	4	0	4/4	100
10 ⁻⁷	2	2	2	2	2/4	50
10 ⁻⁸	0	0	0	4	0/4	0
10 ⁻⁹	0	0	0	4	0/4	0
10 ⁻¹⁰	0	4	0	4	0/4	0
10 ⁻¹¹	0	4	0	8	0/4	0

Fórmula de Reed & Muench:

$$\frac{(\text{n}^\circ \text{ \% imediatamente acima de 50\%}) - (\text{\% abaixo 50\%})}{\text{dose imediatamente acima de 50\%} - \text{dose imediatamente abaixo 50\%}} = \frac{50 - (\text{\% imediatamente abaixo 50\%})}{X - \text{dose imediatamente abaixo 50\%}}$$

O título viral do DENV-2 16681 obtido foi $5,05 \times 10^6$ TCID₅₀/mL e o título do FAVac 17DD é $5,05 \times 10^7$ TCID₅₀/mL.

3.4. Leucócitos mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas de doadores saudáveis que se dirigiam ao setor de Banco de Sangue - HEMOCENTRO do Hospital Universitário Clementino Fraga. As bolsas de fase leucocitária *Buffy Coat* contendo aproximadamente 50 mL de volume celular foram doadas após realização de testes sorológicos para Sífilis – VDRL, Doença de Chagas – Hemaglutinação – ELISA, Hepatites – HBsAg – anti-HCV – ALT, HIV-1 e 2 – ELISA, HTLV-1 e 2 – ELISA confirmando sorologia negativa. A autorização para manipulação de células humanas em nosso laboratório foi concedida pelo comitê de ética da FIOCRUZ sob o número 111/000.

3.4.1. Obtenção de monócitos

As células do sangue de doadores humanos, obtidas a partir de bolsas de fase leucocitária *Buffy Coat*, foram obtidas através da técnica de gradiente de densidade. Foi utilizado meio de cultura RPMI 1640 suplementado com L-glutamina 1%; penicilina-estreptomicina 1%; HEPES 20mM. O sangue foi diluído 1/2 em meio RPMI totalizando um volume final de 100 mL. Cada volume de 25 mL de sangue diluído foi lentamente adicionado sobre 15 mL de Ficoll-Hypaque, em tubos Falcon estéreis de 50 mL. Em seguida, o gradiente foi centrifugado a 400g/30 min, à temperatura ambiente. Após centrifugação, o anel de leucócitos, que se forma na interface do meio de cultura com o Ficoll, foi recuperado e submetido a três lavagens por centrifugação com meio RPMI completo a 400g/10 min a 18°C. Cada tubo, no total de quatro, teve o “pellet” ressuspensionado em 5 mL de meio RPMI, distribuído em 5 garrafas de cultura celular de 175 cm² e completado para um volume final de 50 mL. Após 90 min de incubação em estufa 37°C/5% CO₂, o sobrenadante com células não-aderentes foi desprezado e as garrafas foram lavadas duas vezes com meio RPMI. As células foram recuperadas em meio RPMI frio com auxílio de um raspador e centrifugadas a 400g/10 min a 18°C. Uma suspensão celular de 10 mL foi feita, uma alíquota retirada e diluída 1/10 em 0,2% azul de Trypan para contagem em microscópio óptico com auxílio da câmara de Newbauer.

3.4.2. Derivação de células dendríticas

Os monócitos se diferenciam em células dendríticas imaturas através da adição na cultura das citocinas IL-4 e granulócito macrófago-fator estimulador de colônia (do inglês

granulocyte macrophage-colony stimulating factor – GM-CSF). Após a contagem dos monócitos enriquecidos, a suspensão celular foi ajustada para 2×10^6 células por mL, com 10% de SFB, 500 U/mL de GM-CSF e 500 U/mL de IL-4 em meio RPMI 1640 completo. As células foram plaqueadas com 0,5 mL por poço e incubadas em estufa 37°C/5% CO₂. A reposição das citocinas foi realizada a cada 2 dias durante 6 dias, sendo que o procedimento de troca de meio foi feito retirando metade do volume total do poço cuidadosamente e adicionando-se às culturas meio com citocinas 2x e 20% de SFB.

3.4.3. Infecção das culturas de células dendríticas

As células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) obtidas pela técnica descrita acima, foram infectadas retirando-se 0,25 mL do sobrenadante e sendo adicionados 0,25 mL de vírus diluído e de MOCK (sobrenadante de cultura de células Vero). Após a adsorção do inóculo viral por 180 min em estufa 37°C/5% CO₂, 0,25 mL do sobrenadante foi retirado, o volume final acertado para 1,0mL com 500 U/mL de GM-CSF, 500 U/mL de IL-4 e 10% de SFB. De acordo com a cinética, as células infectadas com as cepas virais e MOCK foram coletadas para marcações por citometria de fluxo e os sobrenadantes foram armazenados a -20°C para posterior dosagem de citocinas.

3.5. Citometria de Fluxo

3.5.1. Marcação extracelular para marcadores de superfície

Os monócitos foram marcados um dia após a realização da obtenção por gradiente de densidade, sendo armazenados no intervalo de tempo a 4°C em meio de cultura RPMI com 10% de SFB. As MoDCs foram recuperadas após 7 dias de diferenciação celular e marcadas no mesmo dia.

Após a centrifugação da suspensão celular a 260g por 7 min, as células foram lavadas com 1 mL de solução de lavagem I. O sobrenadante foi desprezado e as células foram plaqueadas com solução de lavagem I em placas de 96 poços com fundo redondo. Após centrifugação a 260g por 7 min a 18°C, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 0,1 mL de solução de bloqueio I, seguido de incubação por 30 min a 4°C. Foram adicionados 0,1 mL de solução de lavagem I e as células foram centrifugadas a 260g por 7 min a 18°C. O sobrenadante foi desprezado e às células foram adicionados 0,02 mL de anticorpo anti-humano CD1a-PE, DC-SIGN-FITC, CD14-FITC, HLA-DP,DQ,DR-FITC, CD80-FITC,

CD38-FITC, OX40L-PE e isotipos. Os anticorpos foram diluídos em solução de lavagem I e incubados por 30 min a 4°C. Após, foram centrifugadas com 0,18 mL de solução de lavagem I. O sobrenadante foi descartado e as células fixadas com 0,25 mL de solução de fixação. As amostras foram guardadas a 4°C para posterior leitura em FACS. A análise dos resultados foi feita pelo programa FlowJo (TreeStar[®], Ashland, US), sendo adquiridas pelo menos 5.000 células nas regiões estudadas. Para a marcação de OX40L, foi utilizada a ferramenta de análise “Histogram Subtraction” que utiliza a metodologia de Overton (pegar referência) para detecção de células que emitem baixa fluorescência do marcador em questão. A análise mais sensível foi calculada pelo programa Summit (Dako[®], Dinamarca).

3.5.2. Marcação intracelular para antígeno viral

As células foram recuperadas de acordo com as cinéticas e marcadas no mesmo dia. As suspensões celulares foram centrifugadas com 1,0 mL de solução de lavagem I a 260g / 7 min. O sobrenadante foi desprezado e as células foram plaqueadas em placas de 96 poços com fundo redondo. Após centrifugação a 260g por 7 min, o sobrenadante foi desprezado e as células fixadas com 0,1 mL de solução de fixação com incubação por 20 min a 4°C. Após, foram adicionados 0,1 mL de solução de permeabilização, seguindo de centrifugação a 260g por 7 min. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 0,2 mL de solução de permeabilização, seguindo de incubação por 10 min a 4°C. As células foram centrifugadas a 260g por 7 min e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 0,1 mL de solução de bloqueio I e realizada incubação por 30 min a 4°C. Foram adicionados 0,1 mL de solução de permeabilização e as células foram centrifugadas a 260g por 7 min. O sobrenadante foi desprezado e às células foram adicionados 0,02 mL de anticorpo primário anti-Dengue (1/100) ou anti-febre amarela (1/200) diluídos em solução de permeabilização, seguido de incubação por 60 min a 4°C. Após, foram lavadas com 0,18 mL de solução de permeabilização. Foram adicionados 0,02mL de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Alexa Fluor 488[®] diluído 1/400 com incubação por 30 min a 4°C. Após, foram lavadas com 0,18 mL de solução de permeabilização. O sobrenadante foi descartado e as células fixadas com 0,25 mL de solução de fixação. As amostras foram guardadas a 4°C para posterior leitura em FACS. A análise dos resultados foi feita pelo programa FlowJo, sendo adquiridas pelo menos 5.000 células nas regiões estudadas.

3.6. Detecção de citocinas nos sobrenadantes das culturas

Foi utilizado um kit de ELISA (do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*) para detecção de TNF- α no sobrenadante das culturas. A padronização do kit de TNF- α foi realizada em nosso laboratório porém os dados não são aqui demonstrados. Para detecção das outras citocinas foi utilizado um kit de tecnologia de análise múltipla para citocinas (do inglês *Multiplex Cytokine Analysis Technology*), Luminex[®] (Beadlyte[®], Upstate) para detecção de IFN- α , IL-6, IL-1ra, IL-10, MCP-1, MIP1- β , IP-10 e RANTES.

O TNF- α foi detectado nos sobrenadantes das culturas pela técnica de ELISA utilizando kits da PeproTech[®], que foram padronizados de acordo com a literatura [261]. Placa de 96 poços (Maxi-sorp – Nunc[®]) foi sensibilizada com 0,1 mL de anticorpo captura diluído 1/100 em PBS 1x e incubada *overnight* a temperatura ambiente. Posteriormente, foram efetuadas quatro lavagens com 0,25 mL de solução de lavagem II para adição de 0,250 mL de solução de bloqueio II. A placa foi agitada por 60 min a temperatura ambiente. Após quatro lavagens com solução de lavagem II, as amostras foram distribuídas na placa juntamente com a curva padrão. A placa foi incubada *overnight* a 4°C. Após quatro lavagens com solução de lavagem II, o anticorpo detecção diluído 1/400 em solução diluente foi adicionado e a placa mantida por 120 min a temperatura ambiente, sob agitação. Após seis lavagens com solução de lavagem II, estreptavidina-HRP diluída 1/2000 em solução diluente foi adicionada e mantida por 30 min a temperatura ambiente sob agitação. Após oito lavagens com solução de lavagem II, 0,1 mL de TMB (tetrametilbenzidina) foi adicionado e incubado por 30 min a temperatura ambiente sob agitação. A leitura da placa foi feita a 630 nm e o cálculo das amostras foi feito por regressão linear pelo programa Magellan 5.0 (Tecan[®], Männedorf, Switzerland).

O ensaio de detecção multiplex Luminex[®] consiste na detecção de várias citocinas em um mesmo poço utilizando microesferas específicas para cada citocina (mais informações no <http://www.luminexcorp.com>). Esta técnica vem sendo utilizada por vários grupos de pesquisa [262-264] e também pela nossa equipe [107, 265]. Cada microesfera possui uma mistura de dois fluorocromos que as diferenciam umas das outras. As microesferas são recobertas com anticorpos que se ligam a uma citocina específica. Um anticorpo marcado com ficoeritrina (PE) se liga ao complexo citocina-microesfera, determinando a quantidade de ligante no complexo. Esse sistema será lido no aparelho por dois lasers: o primeiro identifica a microesfera analisada e o segundo determina a concentração da citocina ligada à microesfera. Comparando com as curvas padrões fornecidas pelo kit, é obtida a concentração de cada citocina calculada estatisticamente. O protocolo utilizado na dosagem dos sobrenadantes de cultura foi realizado de acordo com o fabricante do kit Beadlyte[®], Upstate (catálogo #48-510).

Suscintamente, foram plaqueadas em placas de 96 poços com filtro no fundo: um pool de microesferas de cada citocina analisada e, as amostras ou a curva padrão ressuspensa de citocinas seguindo de incubação *overnight* a 4°C sob agitação. A placa foi lavada à vácuo e foi adicionado um pool de anticorpos biotinizados para as citocinas. Após incubação de 90min a temperatura ambiente e sob agitação, foi adicionada estreptavidina-PE prosseguindo de incubação por 30 min nas mesmas condições. Uma solução STOP fornecida foi adicionada e a placa foi lavada à vácuo. Após ressuspensão das microesferas com tampão, foi realizada a leitura da placa no aparelho Luminex[®] Instrumentation System. O cálculo das amostras foi processado pelo programa fornecido pelo aparelho. Os doadores testados que induziram a produção de determinada citocina acima do limite do teste, foram descartados.

3.7. Análises estatísticas

Todos os dados obtidos são pareados. Os dados das taxas de replicação viral foram demonstrados como média e erro padrão por apresentarem distribuição paramétrica e foram analisados por test t de Student pareado. Os outros dados foram analisados pelo teste de Postos com Sinais Wilcoxon (em inglês *Wilcoxon signed-rank test*), um teste não-paramétrico alternativo ao test T de Student's pareado; e quando o número de doadores foi superior a seis. As correlações obtidas foram calculadas pelo coeficiente de correlação de postos de Spearman (teste não-paramétrico). Todas as análises estatísticas foram calculadas pelo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA).

3.8. Material e reagentes

3.8.1. Meios de Cultura

Meio 199 Earle's #M5017 – Sigma

Meio Eagle Earle #11700-077 – Gibco

Meio RPMI 1640 #12633 – Gibco

3.8.2. Reagentes

Bicarbonato de Sódio P.A. #302 - ISO FAR

L-Glutamina #21051-024 - GibcoBRL

Fungizona #15290-018 – Gibco

Penicilina-Estreptomicina #15140-122 – Gibco

Aminoácidos não essenciais #11140-050 – Gibco

Triptose Fosfato #T8782 – Sigma

Soro Fetal Bovino #10270-106 – Gibco

HEPES #15630-080 – Gibco

Ficoll-Paque™ Plus #17-1440-03 – Amercham Biosciences AB

Citocina humana recombinante Interleucina-4 humana #200-04 – PeproTech

Citocina humana recombinante GM-CSF #300-03 – PeproTech

Albumina Bovina (BSA) #A-8022 – Sigma

Saponina #S-7900 – Sigma

Paraformaldeído #P6148-500G – Sigma

Azul de Trypan – Sigma

Tween 20™ (*Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate*) #P-1379 – Sigma

Human TNF- α ELISA Development Kit (Padrão, Anticorpos Captura e Detecção) #900-K25-EDK – PeproTech

Estreptavidina-HRP #43-4323 – Zymed

TMB (tetrametilbenzidina) #52-00-01 – KPL

Kit de detecção de citocinas multiplex Luminex® Beadlyte® #48-510 – Upstate

3.8.3. Soluções

PBS (Tampão fosfato) pH 7.4 (10x)

Cloreto de sódio.....	80 g
Cloreto de potássio.....	2 g
Fosfato dibásico de sódio.....	24,20 g
Fosfato monobásico de potássio.....	1,4 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Bicarbonato de sódio

Bicarbonato de Sódio	7,5 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução de azul de trypan 2%

Azul de trypan	2 g
PBS q.s.p.	100 mL

3.8.3.1. Soluções para Citometria de Fluxo

Solução de Lavagem I – BSA 1% Azida 0,1% PBS 1x

Azida Sódica.....	0,1 g
BSA	1 g
PBS q.s.p.	100 mL

Solução de bloqueio I – BSA 1% Azida 0,1% Plasma autólogo 5% PBS 1x

Azida sódica.....	0,1 g
BSA	1 g
Plasma autólogo	5 mL
PBS q.s.p.	100 mL

O plasma autólogo deve ser inativado a 56°C por 30 min.

Solução de permeabilização – BSA 1% Azida 0,1% Saponina 0,15% PBS 1x

Azida sódica 0,1 g
BSA 1 g
Saponina 0,15 g
PBS q.s.p. 100 mL

Solução de fixação – Paraformaldeído 2% PBS 1x

Paraformaldeído 2 g
PBS q.s.p. 100 mL

3.8.3.2. Soluções para ELISA

Solução de lavagem II – Tween 20 0,05% PBS 1x

Tween 20 0,5 mL
PBS q.s.p. 1000 mL

Solução de bloqueio II – BSA 1% PBS 1x

BSA 1 g
PBS q.s.p. 100 mL

Solução diluente – BSA 0,1% Tween 20 0,05% PBS 1x

BSA 0,1 g
Tween 20 0,05 mL
PBS q.s.p. 100 mL

3.8.4. Anticorpos

Anticorpo de camundongo anti-Dengue complexo #MAB8705 Chemicon International (1/100)

Anticorpo de camundongo anti-febre amarela #9801-8019 Biogenesis (1/200)

Anticorpo anti-IgG de camundongo (F(ab')₂) – FITC #F0313 – DakoCytomation (1/25)

Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (H+L) – Alexa Fluor[®] 488 – Molecular Probes #A-11001 (1/400)

Anticorpo de camundongo anti-DC-SIGN humano – FITC #FAB161F – R&D Systems (1/5)

Anticorpo de camundongo IgG2b- FITC #FAB161F – Caltag (1/40)

Anticorpo de camundongo anti-CD1a humano – PE #IM1942 – IOTest (1/5)

Anticorpo de camundongo IgG1-PE #IM0670 – IOTest (1/5)

Anticorpo de camundongo anti-CD14 humano – FITC clone TÜK4 #F0844 – DakoCytomation (1/50)

Anticorpo de camundongo IgG2a-FITC #X0933 – DakoCytomation (1/80)

Anticorpo de camundongo anti-CD80 humano – FITC #PNIM1853 – IOTest Immunotech (1/20)

Anticorpo de camundongo IgG1 – FITC #X0927 – DakoCytomation (1/20)

Anticorpo de camundongo anti-antígeno HLA-DP,DQ,DR humano – FITC clone CR3/43 #F0817 – DakoCytomation (1/50)

Anticorpo de camundongo IgG1 – FITC #X0927 – DakoCytomation (1/50)

Anticorpo de camundongo anti-CD38 humano – FITC clone HIT2 #MHCD3801 – Caltag (1/50)

Anticorpo de camundongo IgG1-FITC #0102-02 – Southern Biotech (1/50)

Anticorpo de camundongo anti-OX40L humano – PE clone Ik-1 #558164 – BD Pharmingen (1/10)

Anticorpo de camundongo IgG1-PE # MG104 - Caltag (1/10)

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização morfológica e fenotípica de culturas de células dendríticas derivadas de monócitos periféricos humanos

Células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) foram geradas a partir de culturas enriquecidas com monócitos originados de leucócitos mononucleares do sangue periférico humanos (PBML) de doadores saudáveis. A morfologia e os aspectos celulares das culturas em diferenciação foram acompanhados por microscopia óptica. Os monócitos apresentaram uma morfologia bem esférica e regular, dando aspecto de uniformidade na cultura. Durante a diferenciação em MoDCs, conforme eram adicionadas as citocinas recombinantes IL-4 e GM-CSF às culturas, as células foram sofrendo modificações morfológicas, se tornando aumentadas e mais arredondadas que os monócitos. No último dia de diferenciação, a cultura não era mais regular e apresentava agrupamentos celulares, formados pelas células arredondadas. Os grupos celulares ou *clusters* estavam dispersos em todo poço e eram encontrados fracamente aderidos no fundo do poço e no sobrenadante da cultura.

Para observar o *status* de diferenciação das MoDCs, as culturas foram caracterizadas antes e após o término da adição das citocinas recombinantes IL-4 e GM-CSF. As populações de monócitos enriquecidas a partir de PBML e MoDCs obtidas foram imunofenotipadas pela expressão dos marcadores extracelulares CD1a, CD14 e DC-SIGN ([Figura 4.1](#)). Analisando os parâmetros de tamanho (FSC, do inglês *Forward Scatter*) e granulosidade (SSC, do inglês *Side Scatter*), os monócitos foram selecionados na região R0 ([Figura 4.1.A, superior](#)) típica dessa população e foram fenotipicamente: CD14 positivo ($92,4 \pm 1,6\%$ de erro padrão, SEM; n=3), DC-SIGN negativo ($3,2 \pm 1,7\%$; n=3) e CD1a negativo ($0,5 \pm 0,1\%$; n=2) ([Figura 4.1.B, superior](#)). Já as MoDCs foram selecionadas na região R1 ([Figura 4.1.A, inferior](#)) e apresentaram células maiores e mais granulosas que as células da região R0. A região R1 continha células CD14 negativas ($1,8 \pm 0,85\%$ SEM; n=2), DC-SIGN positivas ($74,5 \pm 4,5\%$; n=12) e CD1a positivas ($53,7 \pm 6,1\%$; n=12) ([Figura 4.1.B, inferior](#)).

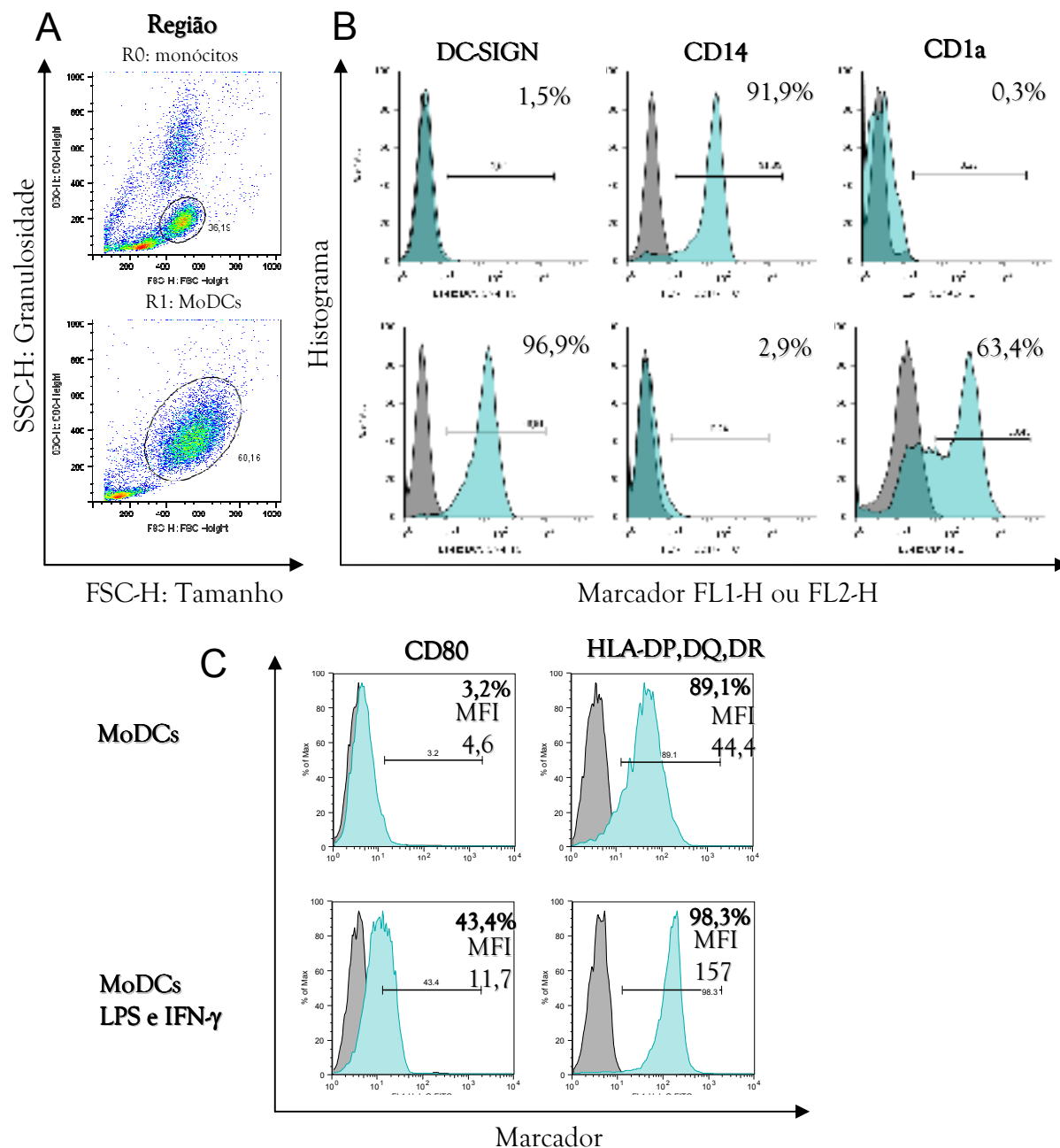


Figura 4.1: Caracterização fenotípica das populações de monócitos e de células dendríticas derivadas de monócitos periféricos humanos. A população de monócitos foi enriquecida a partir de PBML de doadores saudáveis ou derivada em células dendríticas por adição de IL-4 e GM-CSF às culturas. As células foram marcadas por citometria de fluxo. Em **A**, as regiões morfológicas das populações celulares: monócitos em R0 e células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) em R1. O eixo x representa o tamanho celular e o eixo y representa a granulosidade celular. Em **B**, a expressão de marcadores fenotípicos das populações celulares selecionadas em **R0** e **R1**. As culturas celulares foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-humano CD14-FITC, DCSIGN-FITC e CD1a-PE. A análise dos marcadores celulares CD14/DC-SIGN-FITC e CD1a-PE está representada nos histogramas, os superiores representam a expressão dos marcadores na região **R0** e inferiores, a expressão dos marcadores na região **R1**. Dados representativos de 2 doadores. Histograma da marcação de CD1a representativo de 13 doadores. Em **C**, a expressão dos marcadores de ativação CD80 e HLA DP,DQ,DR em MoDCs. No final do período de diferenciação, foram adicionadas ou não às culturas 10 μ g/mL de LPS e 100 U/mL de IFN- γ às culturas. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-humano CD80-FITC e HLA DP,DQ,DR-FITC. Os histogramas superiores representam a expressão dos marcadores na região **R1** das culturas sem adição dos estímulos e inferiores, a expressão dos marcadores nas culturas com adição dos estímulos.

Para um doador, foi realizada uma fenotipagem objetivando verificar o status de maturação das MoDCs. O acréscimo de lipossacarídeo bacteriano (LPS) e da citocina recombinante IFN- γ foi utilizado como estímulo para maturação. As MoDCs sem estímulo apresentaram-se positivas para CD80 em apenas 3,2% das células (MFI 4,6) e positivas para HLA-DP,DQ,DR em 89,1% (MFI 44,4) (Figura 4.1.C, superior). As células estimuladas com LPS e IFN- γ foram 43,4% CD80 positivas (MFI 11,6) e 98,3% (MFI 157) HLA-DP,DQ,DR positivas (Figura 4.1.C, inferior). Um aumento da taxa de células de expressão positiva foi mostrado para ambas moléculas CD80 e HLA-DP,DQ,DR; sendo que para a última houve também aumento a intensidade de expressão da molécula por células (MFI). Concluímos assim que nosso processo de diferenciação induziu células dendríticas imaturas.

4.2. Interações entre as MoDCs e os vírus DENV-2 e FAVac

4.2.1. Cinética de infecção dos vírus DENV-2 e FAVac

As cinéticas de infecção das MoDCs foram determinadas inoculando-se o DENV-2 e o FAVac em doses equivalentes e ainda numa segunda concentração de FAVac (concentrada). Para tal, foram calculadas as doses em TCID₅₀/mL para os inóculos virais. O título do vírus DENV-2 obtido foi $5,05 \times 10^{-6}$ TCID₅₀/mL e o título do FAVac 17DD foi $5,05 \times 10^{-7}$ TCID₅₀/mL. Assim foi utilizada a diluição 1/5 para o DENV-2 e a diluição 1/50 para o FAVac equivalente, uma vez que o FAVac está dez vezes mais concentrado que o DENV-2. Foi utilizado também o inóculo do FAVac mais concentrado 1/10. As doses inoculadas foram portanto $2,525 \times 10^{-5}$ TCID₅₀/mL para o DENV-2 e o FAVac equivalente e $5,05 \times 10^{-6}$ TCID₅₀/mL para o FAVac concentrado. O controle de MOCK utilizado foi diluído 1/5.

Na figura 4.2.A observamos os perfis da expressão dos antígenos intracelulares. Ambos anticorpos utilizados (anti-DENVcomplex e anti-FA) demonstraram, no histograma de análise por FACS, dois picos de intensidade de fluorescência, um negativo e outro positivo. Em todos os doadores testados a porcentagem de antígenos virais nas MoDCs inoculadas com MOCK foi menor que 0,5%.

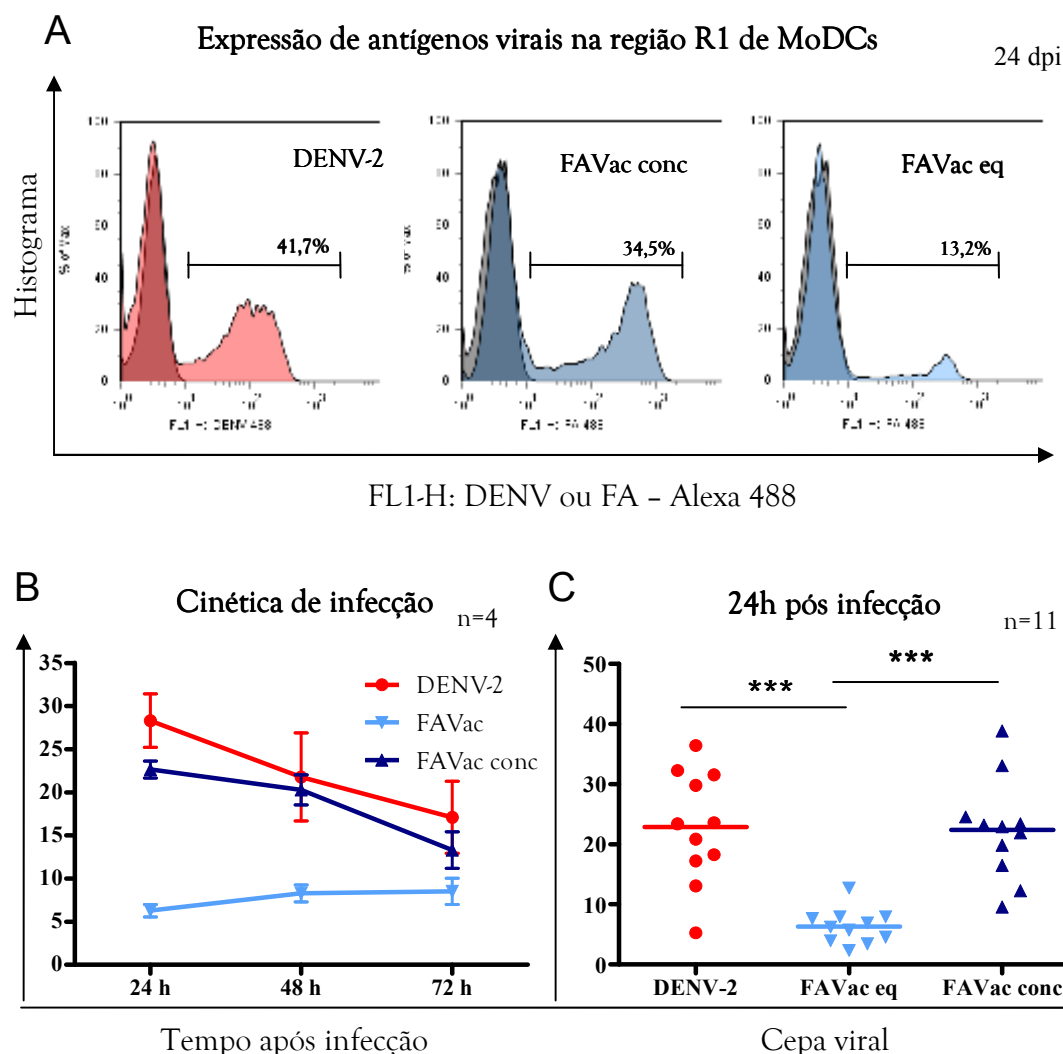


Figura 4.2: Infecção de culturas de células dendríticas diferenciadas de monócitos com DENV-2 16681 e FAVac 17DD. MoDCs foram diferenciadas de culturas enriquecidas de monócitos e infectadas com $2,525 \times 10^{-5}$ TCID₅₀/mL para DENV-2 e FAVac equivalente e $5,05 \times 10^{-6}$ TCID₅₀/mL para FAVac concentrado e controle de MOCK. As células foram recuperadas e marcadas com anticorpo anti-DENV ou anti-FA de acordo com a cinética em triplicata para cada doador. A análise foi realizada por citometria de fluxo. Em **A**, padrões do FACS para antígenos de DENV e FAVac 24 horas após a infecção *in vitro* de células dendríticas. Os gráficos representam o histograma da distribuição das células pela intensidade de fluorescência do canal FL1-H, detector de Alexa 488. Os histogramas demonstram a marcação de células inoculadas com MOCK (cinza) e vírus (colorido) – as cores intensas em cada figura representam a sobreposição dos dois histogramas. Os histogramas coloridos representam DENV-2 (vermelho), FAVac concentrado (azul escuro) e FAVac equivalente (azul claro). Em **B**, a cinética de detecção do antígeno viral nas MoDCs inoculadas com as cepas virais em 4 doadores. O eixo x representa o tempo após infecção e o eixo y representa a porcentagem de células positivas para o antígeno viral. Em **C**, a detecção de antígenos virais intracelulares 24 horas após infecção em 11 doadores. As linhas horizontais representam a média da distribuição e *** representam $p < 0,0001$ (teste t de Student pareado). O eixo x representa o inóculo viral e o eixo y representa a porcentagem de células positivas para o antígeno viral.

Ao observarmos as cinéticas de infecção nas células dendríticas (Figura 4.2.B), detectamos em quatro doadores de PBML que o DENV-2 e o FAVac concentrado apresentaram maior porcentagem de células positivas para o antígeno viral do que o MOCK.

Essa detecção 24h após a infecção foi precoce e máxima para o DENV-2 e o FAVac concentrado com média de $28,3 \pm 3,10\%$ SEM para o DENV-2 e $22,6 \pm 1,0\%$ para o FAVac concentrado, seguindo-se diminuições gradativas com $21,8 \pm 5,1\%$ para o DENV-2 e $20,3 \pm 1,7\%$ para o FAVac concentrado 48 horas após a infecção e, após 72 horas de infecção, a porcentagem de células positivas foi $17,1 \pm 4,2\%$ para o DENV-2 e $13,3 \pm 2,1\%$. Já o FAVac equivalente apresentou menores taxas de infecção e pico mais tardio com $6,3 \pm 0,7\%$ para 24 horas após a infecção, seguido de $8,3 \pm 1,0\%$ para 48 horas e $8,5 \pm 1,5\%$ para 72 horas, não atingindo as taxas elevadas das outras duas amostras.

Para as comparações entre as taxas de replicação/detecção das cepas virais nas células, o ponto de 24 horas após a infecção foi escolhido. Na figura 4.2.C, observamos a distribuição das taxas de infecção para onze doadores de PBML. O DENV-2 demonstrou uma ampla variabilidade de células positivas para o antígeno de DENV com média $22,9 \pm 2,8\%$ SEM. O FAVac concentrado apresentou média similar ao DENV-2 com $22,4 \pm 2,5\%$. Já o FAVac em dose equivalente demonstrou uma média de detecção de $6,3 \pm 0,9\%$, que foi menor e estatisticamente significativa em relação ao DENV-2 ($p < 0,0001$; teste T de Student's) e ao FAVac concentrado ($p < 0,001$).

Concluimos que o FAVac foi capaz de apresentar taxas de infecção comparáveis com as do DENV quando utilizado em doses mais concentradas. Foi então adotada esta dose para os estudos de expressão de ativação e maturação das células infectadas (FAVac).

4.2.2. Expressão dos marcadores de maturação/ativação CD38 e OX40L nas MoDCs infectadas

As MoDCs obtidas foram inoculadas com as cepas virais DENV-2 e FAVac concentrada nas doses descritas, recuperadas 24 a 72 após infecção e a detecção da expressão dos marcadores de ativação e maturação CD38 e OX40L foi realizada através de imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Na figura 4.3.A, observamos o perfil de expressão do marcador de ativação CD38. Houve nos histogramas um deslocamento de intensidade de fluorescência das MoDCs infectadas quando comparamos com a expressão induzida pela incubação com MOCK. Nas células cultivadas com o sobrenadante MOCK (quatro doadores) e nas incubadas apenas com meio de cultura (dois doadores), a porcentagem de MoDCs positivas para o marcador CD38 foi menor que 1,5% em todos os pontos da cinética. De acordo com a figura 4.3.B, os dois flavivírus testados induziram um aumento na expressão do marcador CD38 de 24 para 48 horas; de $1,8 \pm 0,6\%$ para $28,5\% \pm 13,4\%$ para as culturas infectadas com o DENV-2 e; de

2,6 ± 1,3% para 20,8 ± 5,5% para as culturas infectadas com FAVac. Com relação à detecção do antígeno intracelular, foi observado, para os mesmo doadores, uma tendência ao decréscimo da detecção do antígeno viral no mesmo período de tempo. Para o DENV-2 observamos queda de 30,7 ± 3,9% para 19,2 ± 6,2% e para o FAVac de 42,6% ± 8,4% para 29,1 ± 6,5%.

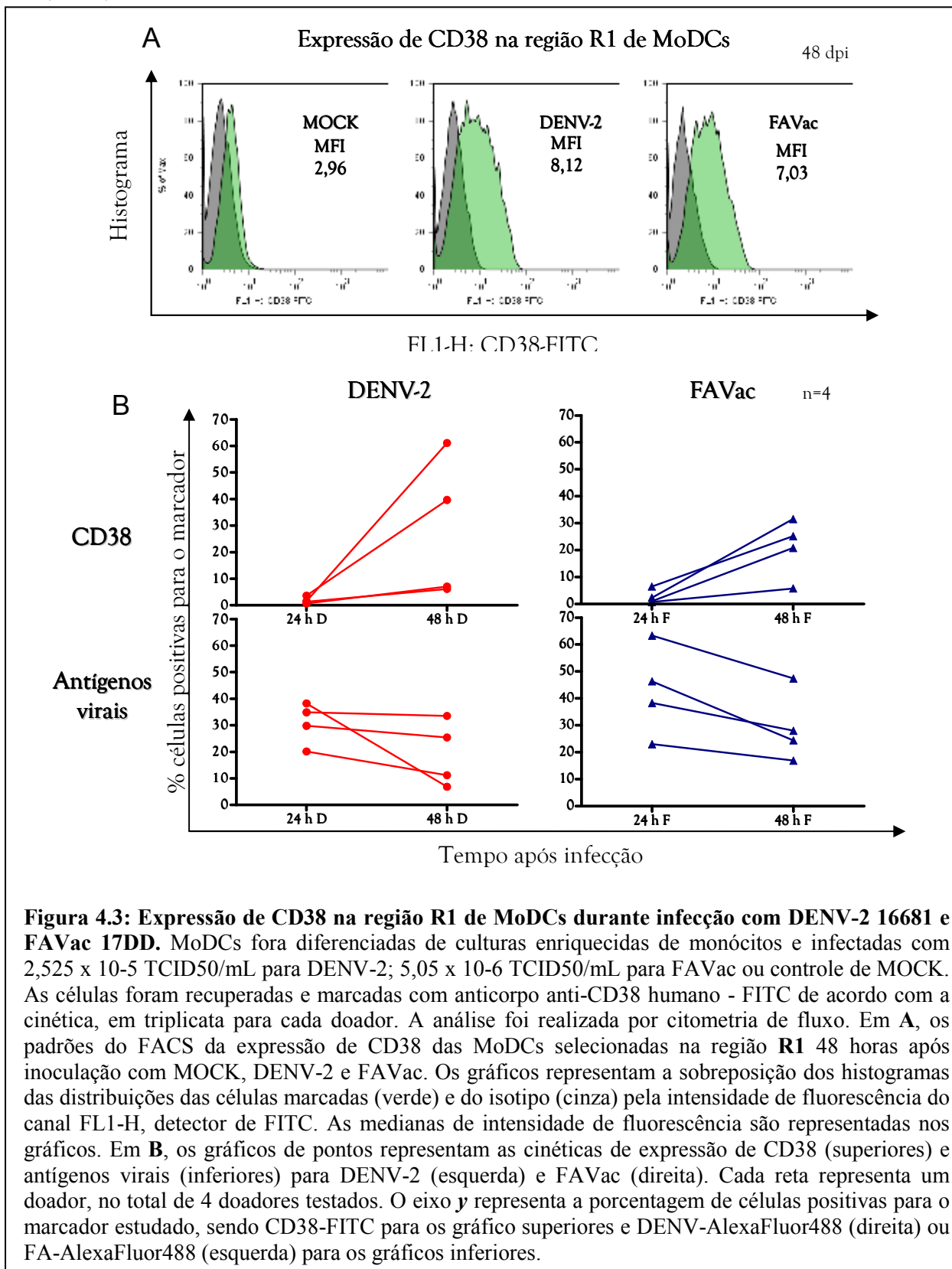


Figura 4.3: Expressão de CD38 na região R1 de MoDCs durante infecção com DENV-2 16681 e FAVac 17DD. MoDCs foram diferenciadas de culturas enriquecidas de monócitos e infectadas com $2,525 \times 10^{-5}$ TCID₅₀/mL para DENV-2; $5,05 \times 10^{-6}$ TCID₅₀/mL para FAVac ou controle de MOCK. As células foram recuperadas e marcadas com anticorpo anti-CD38 humano - FITC de acordo com a cinética, em triplicata para cada doador. A análise foi realizada por citometria de fluxo. Em **A**, os padrões do FACS da expressão de CD38 das MoDCs selecionadas na região **R1** 48 horas após inoculação com MOCK, DENV-2 e FAVac. Os gráficos representam a sobreposição dos histogramas das distribuições das células marcadas (verde) e do isotipo (cinza) pela intensidade de fluorescência do canal FL1-H, detector de FITC. As medianas de intensidade de fluorescência são representadas nos gráficos. Em **B**, os gráficos de pontos representam as cinéticas de expressão de CD38 (superiores) e antígenos virais (inferiores) para DENV-2 (esquerda) e FAVac (direita). Cada reta representa um doador, no total de 4 doadores testados. O eixo **y** representa a porcentagem de células positivas para o marcador estudado, sendo CD38-FITC para os gráfico superiores e DENV-AlexaFluor488 (direita) ou FA-AlexaFluor488 (esquerda) para os gráficos inferiores.

A expressão de OX40L é apresentada na figura 4.4.A nas células cultivadas com MOCK, DENV-2 e FAVac. Observamos no histograma um deslocamento do histograma da marcação de OX40L no MOCK em relação ao controle de isotipo. Essa diferença não é tão evidente quando comparamos os histogramas entre o isotipo e a marcação de OX40L para os dois flavivírus, sugerindo que os vírus possam interferir na expressão desse marcador/molécula.

Devido às dificuldades de calcular manualmente essas diferenças na marcação de OX40L, foi utilizada a ferramenta de análise “Histogram Subtraction” calculada pela metodologia de Overton, descrita na metodologia. Observamos na figura 4.4.B, a cinética de expressão de OX40L para dois doadores. As MoDCs incubadas com meio de cultura exibiram uma expressão marcante do marcador com média \pm SEM de $54,1 \pm 1,8\%$. Já as MoDCs incubadas com MOCK exibiram expressão de $71,7 \pm 3,5\%$ em 24 horas após infecção, caindo moderadamente para $66,6 \pm 0,3\%$ 72 horas após infecção. As culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 exibiram 24 horas após a infecção $65,3 \pm 0,4\%$ de células positivas para OX40L, decaindo gradativamente para $34,4 \pm 4,3\%$ 72 horas após a infecção. A diminuição da expressão desse marcador também foi observada nas culturas de MoDCs infectadas com FAVac, sendo detectada 24 horas após a infecção $64,2\% \pm 0,9\%$; e apresentando 72 horas após infecção $31,1\% \pm 4,6\%$ de positividade.

Ao dividirmos as médias dos valores positivos encontrados utilizando a subtração de histogramas para CD38 e OX40L, em culturas duplo marcadas, obtemos uma taxa CD38/OX40L (Figura 4.4.C). Essa taxa se manteve abaixo de 0,5 para as células inoculadas com meio e MOCK, enquanto as cepas virais induziram um aumento dela nas MoDCs infectadas após 48 horas. Na presença de DENV-2 a taxa de $0,49 \pm 0,01$ aumentou para $1,90 \pm 0,34$ (24 e 72 horas de infecção respectivamente). De forma similar, o FAVac induziu aumento de $0,50 \pm 0,15$ (24 horas) para $1,55 \pm 0,03$ (72 horas).

Observamos que após a infecção de MoDCs por qualquer um dos dois flavivirus há um aumento da expressão de CD38 e diminuição de OX40L, alterando assim as taxas entre os dois marcadores.

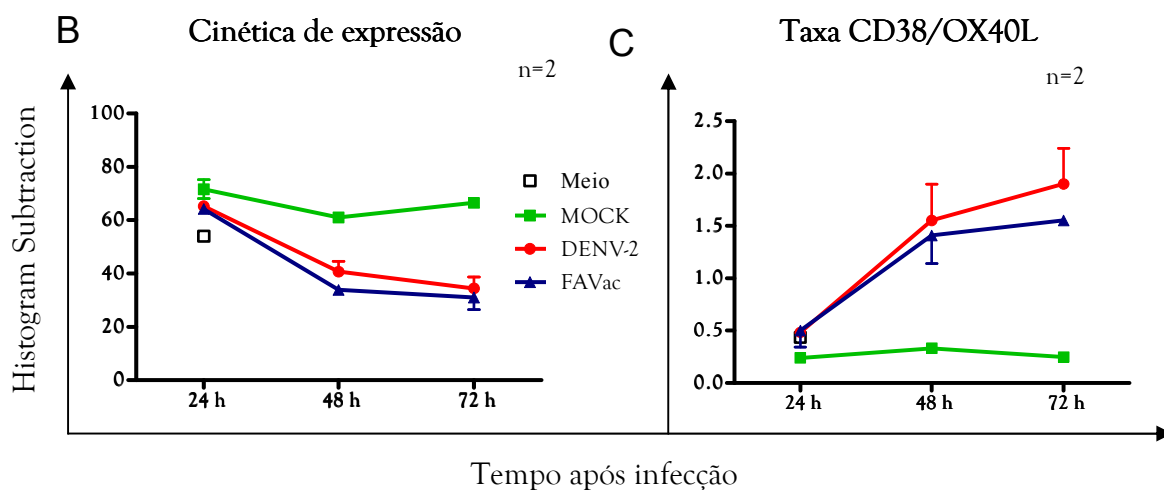
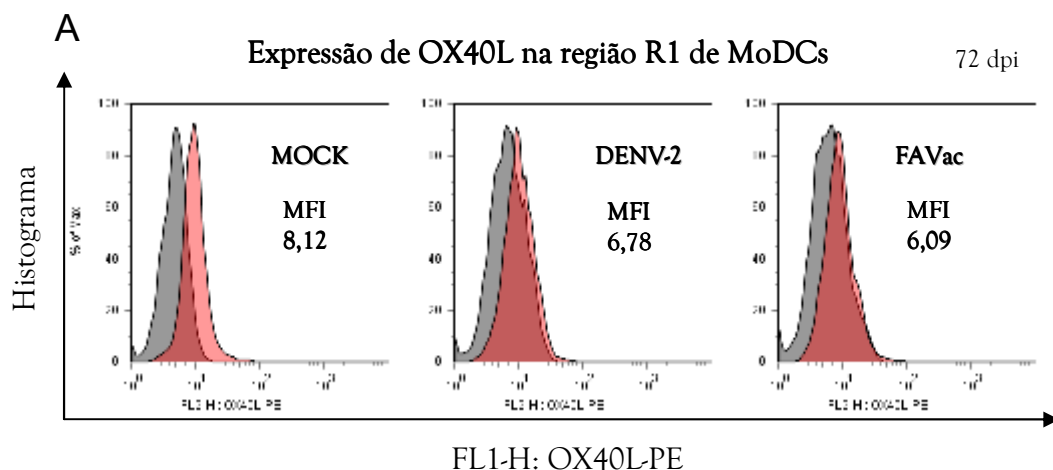


Figura 4.4: Expressão de OX40L na região R1 de MoDCs durante infecção com DENV-2 16681 e FAVac 17DD. MoDCs foram diferenciadas de culturas enriquecidas de monócitos e infectadas com $2,525 \times 10^{-5}$ TCID₅₀/mL para DENV-2; $5,05 \times 10^{-6}$ TCID₅₀/mL para FAVac ou controle de MOCK. As células foram recuperadas e marcadas com anticorpo anti-OX40L humano - PE de acordo com a cinética. A análise foi realizada por citometria de fluxo. Em **A**, os padrões do FACS da expressão de OX40L das MoDCs selecionadas na região **R1** 72 horas após incubação com MOCK, DENV-2 e FAVac. Os gráficos representam a sobreposição dos histogramas das distribuições das células marcadas (vermelho) e do isótipo (cinza) pela intensidade de fluorescência do canal FL1-H, detector de FITC. Em **B**, os gráficos de linhas representam a cinética de expressão de OX40L nas células incubadas com meio (ponto branco), mock (verde), DENV-2 (vermelho) e FAVac (azul). A análise da expressão desse marcador foi realizada por subtração dos isotipos de cada amostra (Histogram Subtraction) através do programa Summit (Dako). Dados representam a média de dois doadores independentes testados em triplicata cada. O eixo *x* representa o tempo após infecção e o eixo *y* representa a porcentagem de células positivas obtida pela subtração do isótipo. Em **C**, os gráficos de linhas representam a taxa obtida pela divisão entre os valores obtidos pela análise por subtração de histogramas para CD38 e OX40L, em células duplo marcadas, no mesmo doador e em diferentes tempos após infecção. O eixo *x* representa o tempo após infecção e o eixo *y* representa a taxa CD38 sobre OX40L.

4.2.3. Detecção de citocinas produzidas nos sobrenadantes pelas culturas de MoDCs infectadas

As MoDCs foram inoculadas com as cepas virais DENV-2, FAVac e com controle de MOCK nas doses descritas no material e métodos. Os sobrenadantes foram recuperados 24 a 72 após infecção para dosagem de TNF- α .

Foi realizada uma cinética da detecção de TNF- α usando-se sobrenadantes de cultura de células de cinco doadores. Na figura 4.5.A observamos os valores representados como média e erro padrão. A produção em 24 horas após infecção da citocina foi de $94,1 \pm 40,4$ pg/mL nas culturas incubadas com MOCK; $209,6 \pm 76,3$ pg/mL nas culturas infectadas com DENV-2 e $61,6 \pm 31,5$ pg/mL nas culturas infectadas com FAVac. O pico de produção de TNF- α foi observado 48 horas após a infecção com $87,0 \pm 42,2$ pg/mL nas culturas incubadas com MOCK; $535,9 \pm 227,5$ pg/mL nas infectadas com DENV-2 e $305,0 \pm 119,6$ pg/mL nas infectadas com FAVac. Já 72 horas após a infecção, essa produção decaiu para $50,2 \pm 20,9$ pg/mL nas culturas com MOCK; $358,9 \pm 156,0$ pg/mL com DENV-2 e $182,7 \pm 69,3$ pg/mL com FAVac.

Em uma análise comparativa, foram testados mais doadores (N=9) no ponto de 48 horas após a infecção, conforme demonstrado na figura 4.5.B. Observamos que as culturas infectadas com DENV-2 induziram TNF- α em níveis mais elevados do que as culturas infectadas com FAVac. De acordo com a tabela 4.1, a mediana dos valores obtidos para os níveis da citocina para as culturas infectadas com DENV-2 e FAVac foi, respectivamente 168,4 e 124,2 pg/mL, sendo que essas medianas foram superiores às detectadas nas culturas incubadas com MOCK (25,60 pg/mL). Detectamos que MoDCs inoculadas com meio de cultura exibem concentrações similares às inoculadas com MOCK (N=5). A diferença entre a produção de TNF- α nas culturas infectadas com DENV-2 e FAVac foi estatisticamente significativa pelo teste de Postos com Sinais de Wilcoxon com $p < 0,02$.

Tabela 4.1: Comparação da produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de MoDCs 48 horas após infecção com DENV-2 e FAVac

Parâmetros	TNF- α		
	DENV-2	FAVac	MOCK
Nº	10	10	9
Primeiro quartil	98,50	88,81	0,0
Mediana	168,4	124,2	25,60
Terceiro quartil	528,1	298,2	113,8

Para resultados em negrito, $p < 0,02$ (teste de Postos com Sinais de Wilcoxon).

Deteção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de MoDCs

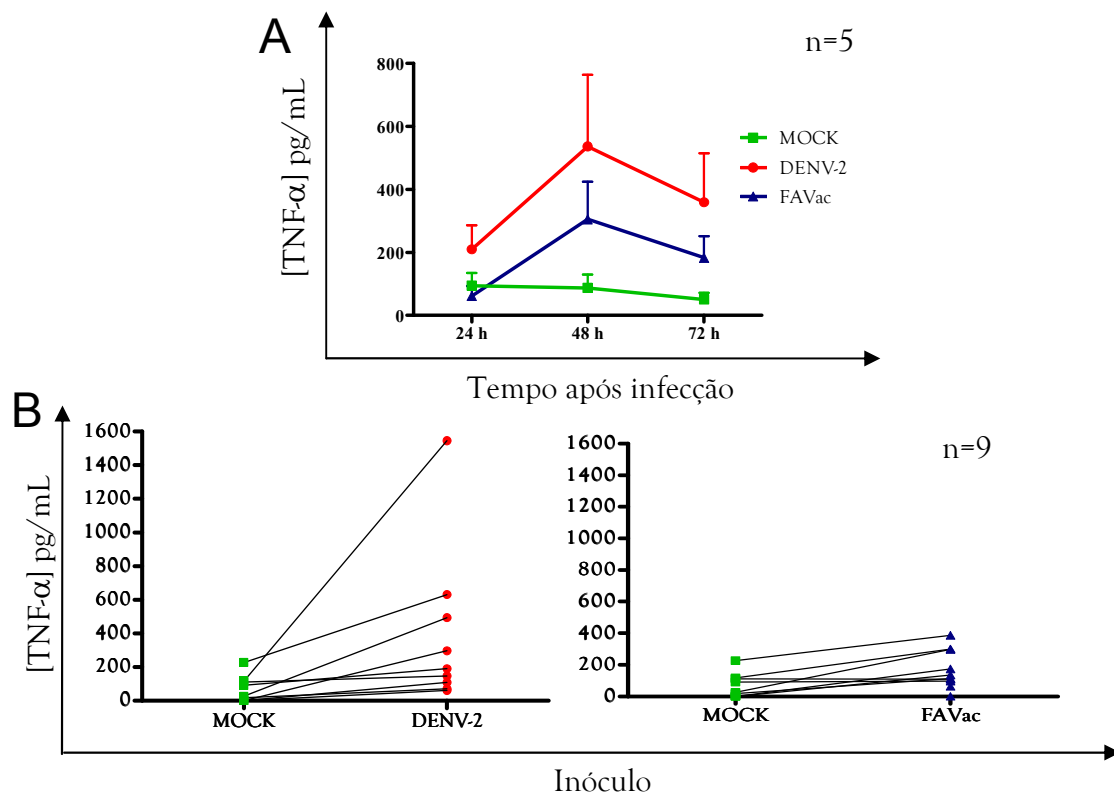
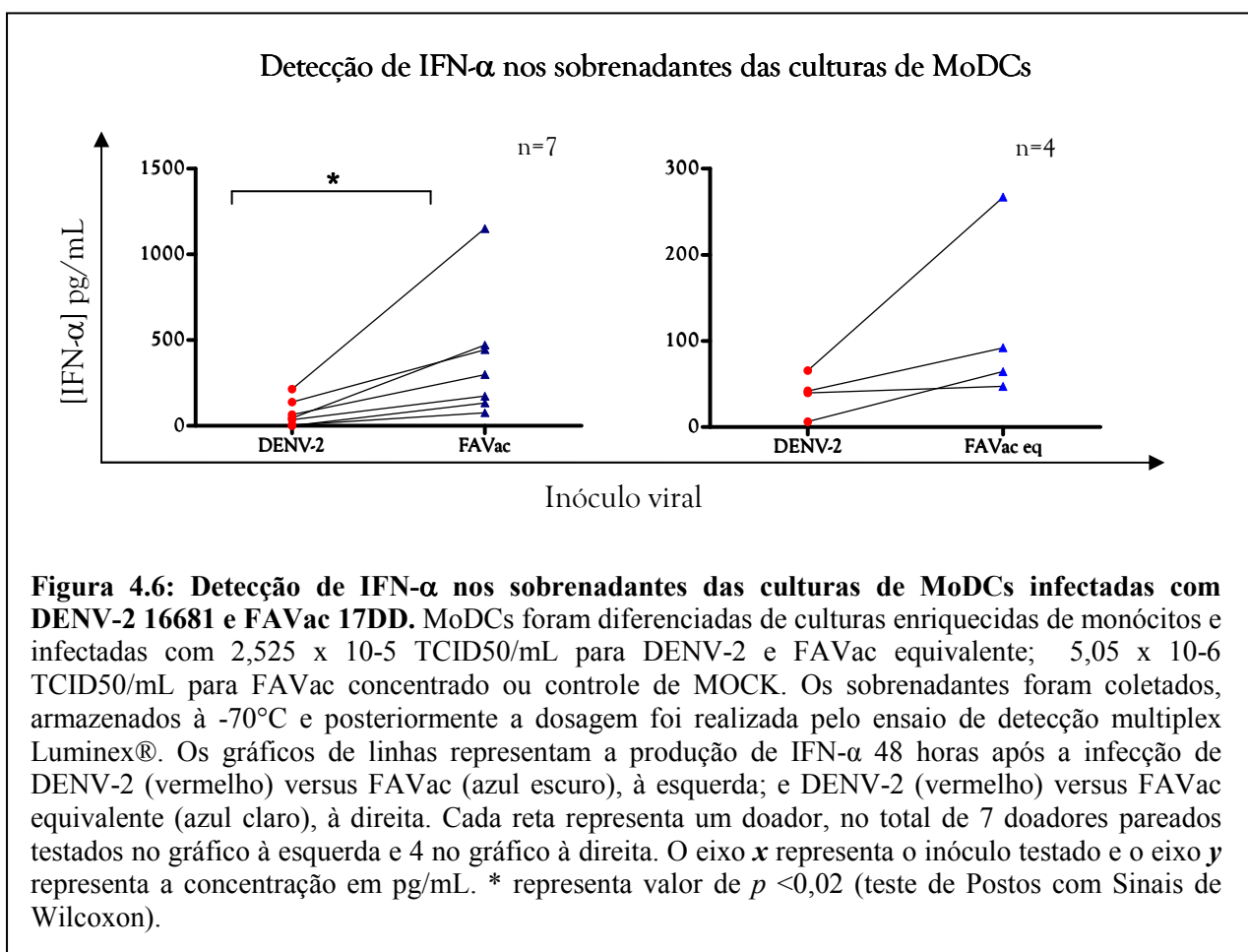


Figura 4.5: Deteção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD. MoDCs foram diferenciadas de culturas enriquecidas de monócitos e infectadas com $2,525 \times 10^{-5}$ TCID₅₀/mL para DENV-2; $5,05 \times 10^{-6}$ TCID₅₀/mL para FAVac ou controle de MOCK. De acordo com a cinética, os sobrenadantes foram coletados, armazenados à -70°C e posteriormente a dosagem foi realizada por ELISA. Em **A**, os gráficos de linhas representam a cinética de produção de TNF- α para 5 doadores nas culturas inoculadas com MOCK (verde), DENV-2 (vermelho) e FAVac (azul). Os pontos representam média e erro padrão. O eixo x representa o tempo após a infecção e o eixo y representa a concentração da citocina em pg/mL. Em **B**, os gráficos de linhas representam a produção de TNF- α 48 horas após a incubação de MOCK (verde) ou DENV-2 (vermelho), à esquerda; e MOCK (verde) ou FAVac (azul), à direita. Cada reta representa um doador, no total de 9 doadores testados. O eixo x representa o inóculo testado e o eixo y representa a concentração em pg/mL.

Ao correlacionarmos a concentração encontrada 48 horas após a infecção para TNF- α com a expressão do marcador de superfície CD38, observamos uma associação positiva e estatisticamente significativa (Spearman $r = 0,7857$; $p < 0,05$) para as culturas infectadas com um dos dois vírus (Tabela 4.2).

O pico de detecção de antígeno viral foi precoce (24h). Optamos portanto em analisar a dosagem simultânea das citocinas pela metodologia multiplex um dia após esse pico; os sobrenadantes foram recuperados 48 após infecção e foram analisadas as concentrações das citocinas IFN- α , IL-6, IL-1ra, IL-10, MIP-1 β /CCL4, MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 e RANTES/CCL5.

A produção de IFN- α é apresentada na figura 4.6. Observamos que as culturas infectadas com FAVac induziram maior produção de IFN- α do que as culturas infectadas com DENV-2. As culturas inoculadas com MOCK (N=7) e também com meio de cultura (N=4) produziram menos que 10 pg/mL de IFN- α . Em sete doadores, a detecção de IFN- α foi maior e estatisticamente significativa nas culturas infectadas com FAVac ($p < 0,02$, teste de Wilcoxon) com medianas de 299,1 e 45,6 pg/mL, para FAVac e DENV-2, respectivamente. Para quatro doadores foram testadas também as culturas inoculadas com FAVac em dose equivalente à usada para o DENV-2 ($2,525 \times 10^{-5}$ TCID₅₀/mL), em que também observamos uma tendência a maior produção de IFN- α pelas culturas infectadas em relação ao DENV-2.



Na figura 4.7, foi calculada a taxa da produção de TNF- α sobre a de IFN- α em culturas infectadas com DENV-2 e FAVac. Observamos, para os sete doadores, que a mediana das taxas para DENV-2 foi maior (9,83) do que a calculada para FAVac (0,73). Observamos que após a infecção de MoDCs por DENV-2 há uma produção aumentada de TNF- α e reduzida de IFN- α em relação ao FAVac, refletindo a diferença da taxa entre as duas citocinas. Essa diferença foi considerada significativa pelo teste de Wilcoxon, sendo $p < 0,02$.

Taxa TNF- α /IFN- α detectada nos sobrenadantes das culturas de MoDCs

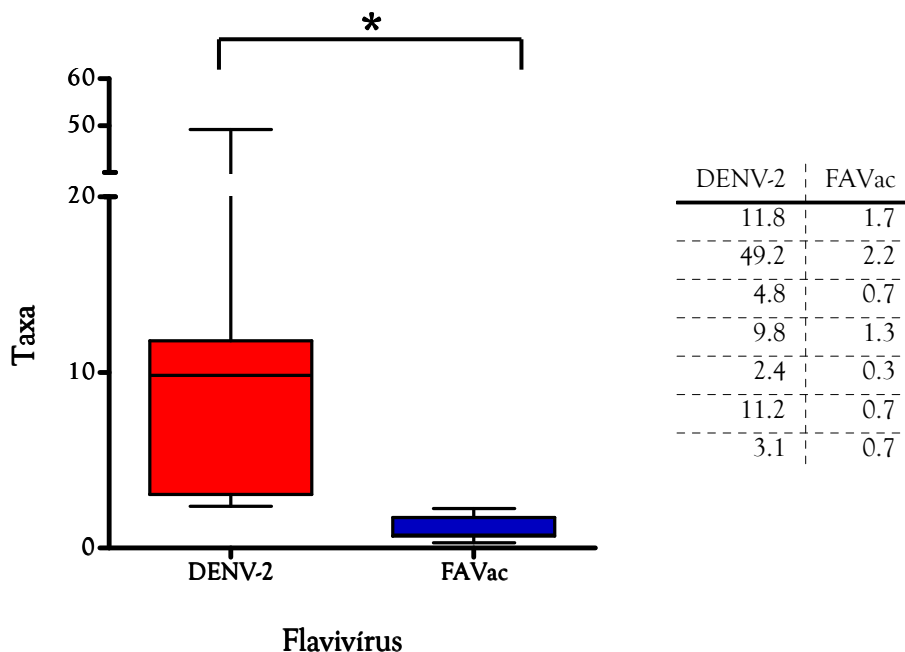


Figura 4.7: Taxa de detecção de TNF- α /IFN- α nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD. MoDCs foram diferenciadas de culturas enriquecidas de monócitos e infectadas com $2,525 \times 10^{-5}$ TCID₅₀/mL para DENV-2; $5,05 \times 10^{-6}$ TCID₅₀/mL para FAVac concentrado ou controle de MOCK. Os boxplots representam as taxas obtidas pela divisão das concentrações (48 horas após infecção) de TNF- α sobre IFN- α por flavivírus e por doador, no total de 7 doadores pareados (dados numéricos à direita). * representa valor de $p < 0,02$ (teste de Postos com Sinais de Wilcoxon).

A produção de IL-6 (Figura 4.8.A) apresentou uma ampla variabilidade entre os diferentes doadores de PBML nas concentrações detectadas em sobrenadantes de MoDCs infectadas. O MOCK e o meio de cultura foram induzidos de maneira semelhante em quatro doadores de MoDCs (393,3 e 195,3 pg/mL; respectivamente). Em sete doadores, a produção de IL-6 induzida por MOCK teve mediana de 303,1 pg/mL, próxima à mediana do DENV-2 com 327,0 pg/mL e a concentração de IL-6 para FAVac foi de 600,2 pg/mL. Assim, para normalizar a produção de IL-6 pra cada doador, a concentração de citocina induzida por DENV-2 foi dividida pela obtida para MOCK, o mesmo acontecendo para FAVac (Figura 4.8.B). Observamos que cinco doadores para DENV-2 e três para FAVac exibiram aumento maior ou igual a 100% em relação ao MOCK (≥ 2) na produção da citocina. Não detectamos porém nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as medianas das taxas obtidas para ambas cepas virais (2,3 para DENV-2 e 1,4 para FAVac).

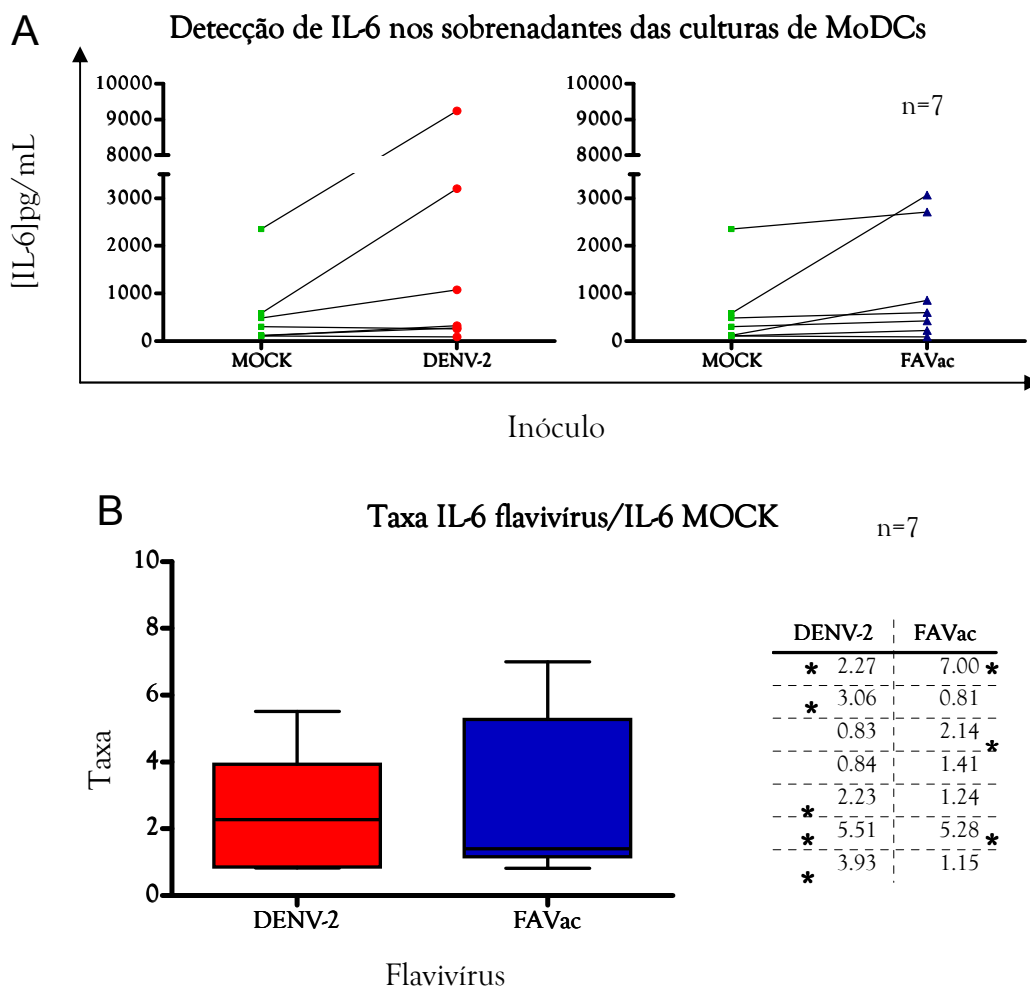
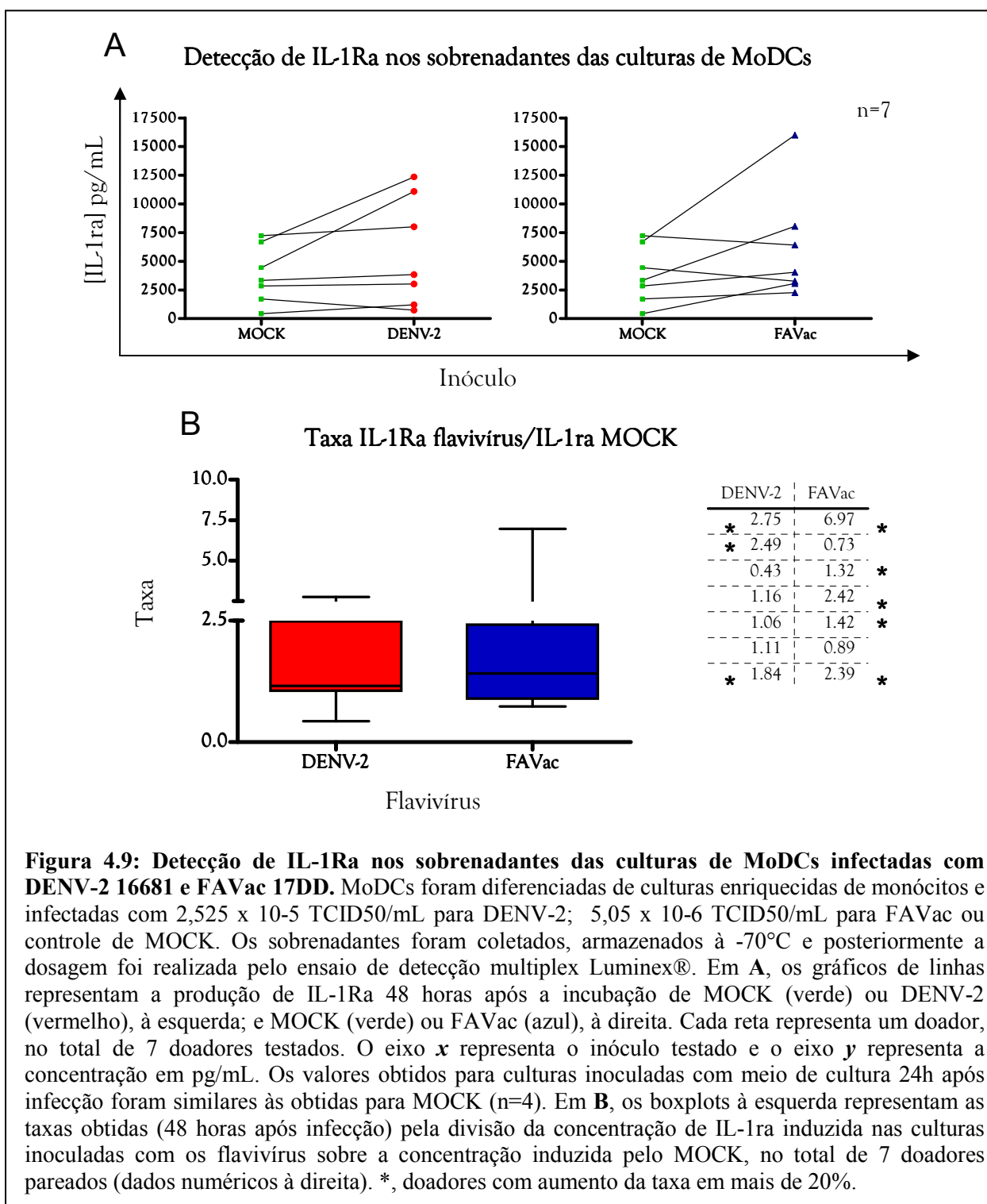


Figura 4.8: Detecção de IL-6 nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD. MoDCs foram diferenciadas de culturas enriquecidas de monócitos e infectadas com $2,525 \times 10^{-5}$ TCID₅₀/mL para DENV-2; $5,05 \times 10^{-6}$ TCID₅₀/mL para FAVac ou controle de MOCK. Os sobrenadantes foram coletados, armazenados à -70°C e posteriormente a dosagem foi realizada pelo ensaio de detecção multiplex Luminex®. Em **A**, os gráficos de linhas representam a produção de IL-6 48 horas após a incubação com MOCK (verde) ou DENV-2 (vermelho), à esquerda; e MOCK (verde) ou FAVac (azul), à direita. Cada reta representa um doador, no total de 7 doadores testados. O eixo *x* representa o inóculo testado e o eixo *y* representa a concentração em pg/mL. Os valores obtidos para culturas inoculadas com meio de cultura 24h após infecção foram similares às obtidas para MOCK (n=4). Em **B**, os boxplots representam as taxas obtidas (48 horas após infecção) pela divisão da concentração de IL-6 induzida nas culturas inoculadas com o flavivírus sobre a concentração induzida pelo MOCK, no total de 7 doadores pareados (dados numéricos à direita). *, doadores com aumento da taxa em mais de 100%.

A produção de IL-1Ra (Figura 4.9.A) foi observada em sete doadores, sendo que foi detectada uma produção de mediana 3.327 pg/mL nas culturas incubadas com MOCK. pg/mL. A mediana obtida para os níveis de IL-1Ra das culturas inoculadas com meio de cultura 24h após infecção (5.526 pg/mL) foi similar à obtida para as culturas inoculadas com MOCK (5.582 pg/mL) quando analisadas nos mesmo doadores (n=4).

As culturas infectadas com DENV-2 e FAVac tiveram mediana 3.848 pg/mL e 4.045 pg/mL, respectivamente (n=7). Na figura 4.9.B foi calculada a taxa da produção de IL-1Ra para cada cepa viral sobre a produção do MOCK. Observamos que a mediana da taxa é levemente superior para o FAVac (mediana 1,41) em relação ao DENV-2 (mediana 1,15), apesar de não serem estatisticamente significantes. Detectamos que ocorreu um aumento superior ou igual a 20% na produção de IL-1Ra em três doadores para DENV-2 e em cinco doadores para FAVac.



Ao correlacionarmos a concentração encontrada para IL-1Ra com a detecção do antígeno viral 24 horas após a infecção, observamos uma associação inversa e estatisticamente significativa (Spearman $r = -0,7857$; $p < 0,05$) para as culturas infectadas com DENV-2. Não foi encontrada uma correlação significativa para as culturas infectadas com FAVac (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Correlação entre os níveis detectados de TNF- α , IL-10 e IL-1Ra com a taxa de células positivas para Ag virais ou para o marcador CD38 em culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 ou FAVac.

Parâmetro	IL-1Ra versus			IL-10 versus		TNF- α versus
	IL-10	DENV-2	FAVac	DENV-2	FAVac	CD38
Pares XY	14	7	7	7	7	7
Spearman r	0,6337	-0,7857	0,3214	-0,3929	0,4286	0,7857
P valor (<i>two-tailed</i>)	0,0150	0,0480	0,4976	0,3956	0,3536	0,0480

Os valores para as citocinas representam as concentrações encontradas 48 horas após a infecção em pg/mL e os valores “DENV-2” e “FAVac” representam as porcentagens de células positivas para o antígeno viral 48 horas após a infecção.

A produção de IL-10 (Figura 4.10.A) foi observada para sete doadores, sendo a mediana dos valores de citocinas induzidas pelo MOCK de 13,4 pg/mL, e pelas cepas virais DENV-2 e FAVac de 17,4 e 30,6 pg/mL, respectivamente. Ao compararmos a produção de culturas inoculadas com meio de cultura 24h após a infecção (37,31 pg/mL) com as culturas inoculadas com MOCK (44,37 pg/mL), observamos valores similares.

Na figura 4.10.B, observamos a taxa de produção dos flavivírus normalizadas frente ao MOCK. A mediana da taxa é superior para o FAVac (mediana 2,08) comparando com a mediana de 1,60 para DENV-2, embora não tenha sido encontrada uma diferença estatística. Observamos que três doadores entre sete para o DENV-2 e quatro doadores para o FAVac foram capazes de induzir um aumento superior ou igual a 100% na produção de IL-10 em relação ao MOCK. Aparentemente não deve haver diferenças entre a indução de IL-10 pelos dois flavivirus.

Ao correlacionarmos a concentração detectada para IL-1ra para as duas cepas virais estudadas com a concentração detectada para IL-10 nos sete doadores (Tabela 4.2), observamos uma associação positiva e estatisticamente significativa (Spearman $r = 0,6337$; $p < 0,02$).

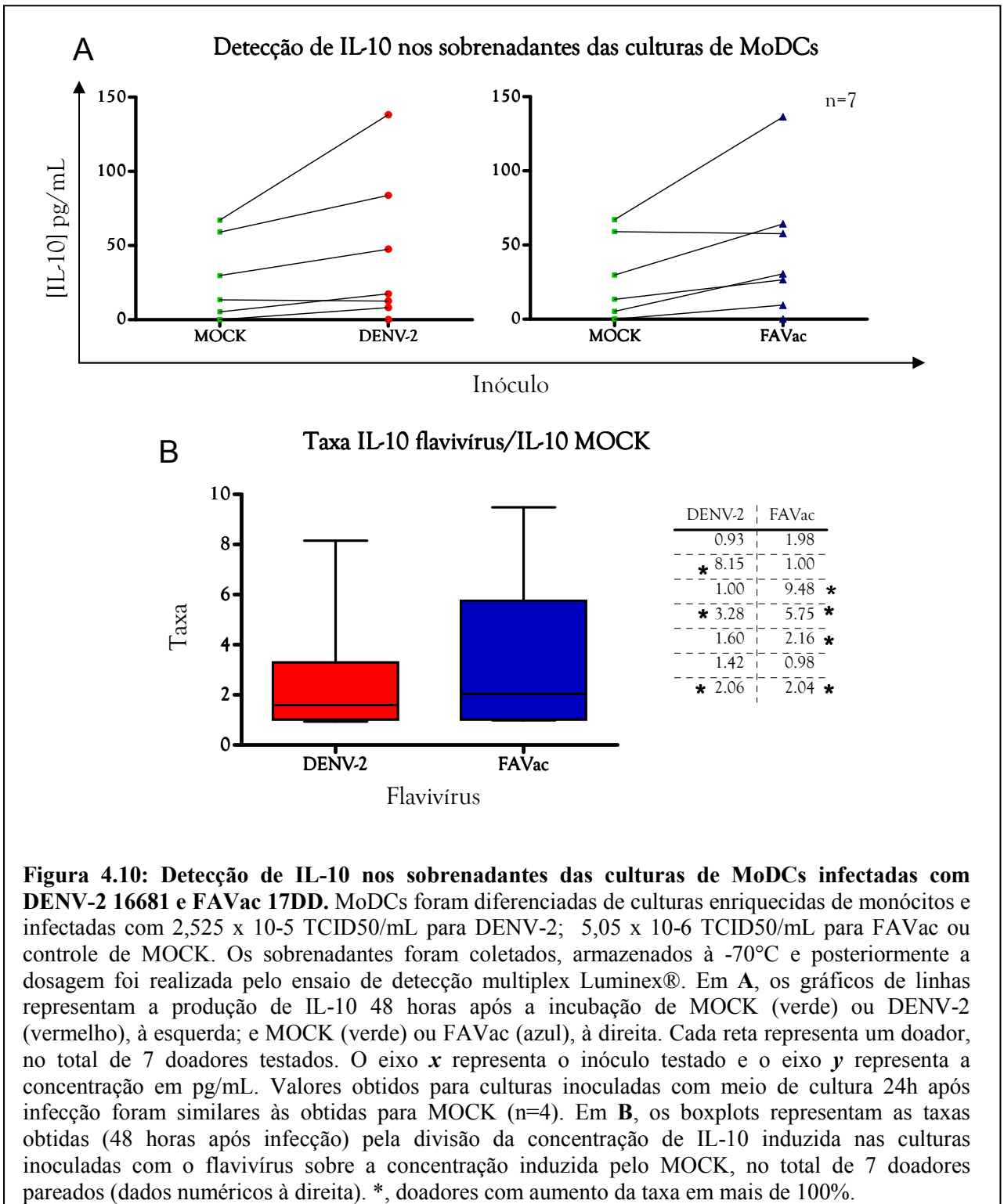
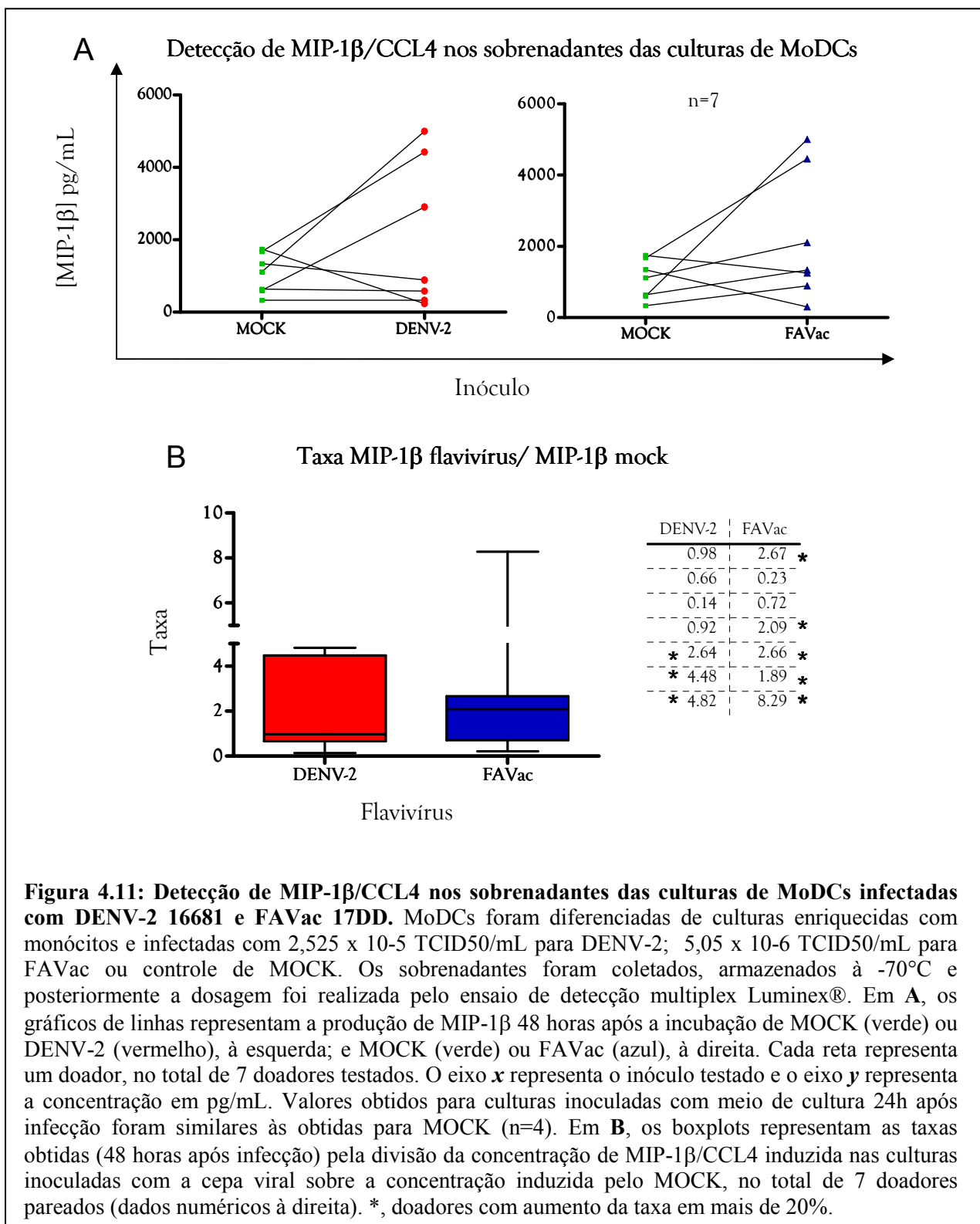


Figura 4.10: Detecção de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 16681 e FAVac 17DD. MoDCs foram diferenciadas de culturas enriquecidas de monócitos e infectadas com $2,525 \times 10^{-5}$ TCID₅₀/mL para DENV-2; $5,05 \times 10^{-6}$ TCID₅₀/mL para FAVac ou controle de MOCK. Os sobrenadantes foram coletados, armazenados à -70°C e posteriormente a dosagem foi realizada pelo ensaio de detecção multiplex Luminex®. Em **A**, os gráficos de linhas representam a produção de IL-10 48 horas após a incubação de MOCK (verde) ou DENV-2 (vermelho), à esquerda; e MOCK (verde) ou FAVac (azul), à direita. Cada reta representa um doador, no total de 7 doadores testados. O eixo *x* representa o inóculo testado e o eixo *y* representa a concentração em pg/mL. Valores obtidos para culturas inoculadas com meio de cultura 24h após infecção foram similares às obtidas para MOCK (n=4). Em **B**, os boxplots representam as taxas obtidas (48 horas após infecção) pela divisão da concentração de IL-10 induzida nas culturas inoculadas com o flavivírus sobre a concentração induzida pelo MOCK, no total de 7 doadores pareados (dados numéricos à direita). *, doadores com aumento da taxa em mais de 100%.

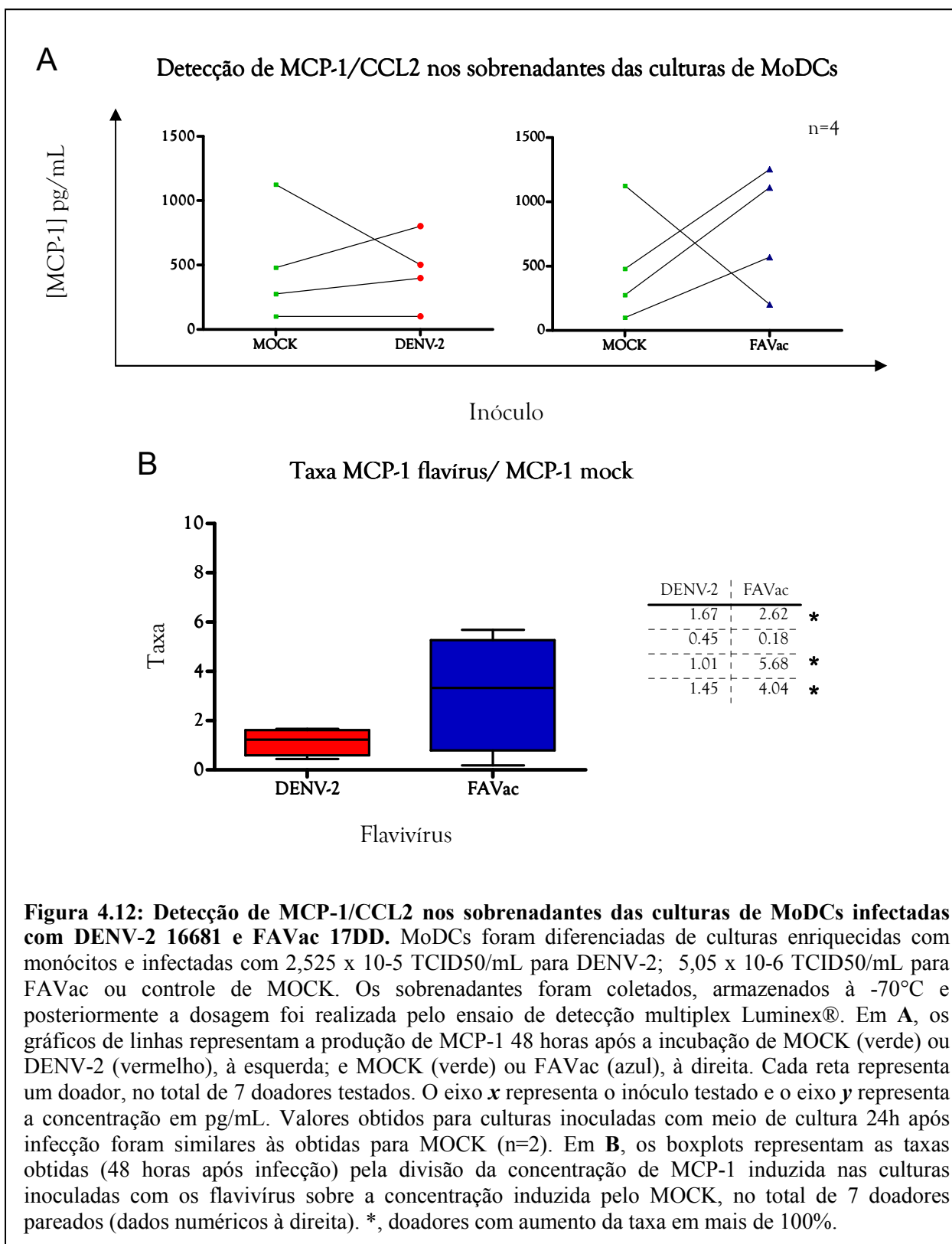
A produção de MIP-1 β /CCL4 (Figura 4.11.A) foi observada sete doadores, sendo detectada uma alta produção dessa citocina nos sobrenadantes das culturas incubadas com MOCK (N=7; mediana 1.116,0 pg/mL). Essa produção foi considerada basal, uma vez que MoDCs inoculadas com meio de cultura (N=4; 1890,0 pg/mL) induziram níveis semelhantes aos induzidos pelo MOCK. Já nas culturas infectadas as medianas foram 886,7 pg/mL e 1.331,0 pg/mL para DENV-2 e FAVac, respectivamente. A taxa de produção para o FAVac sobre o MOCK com mediana de 2,09 foi superior comparando com o DENV-2 (mediana de

0,98), porém não foi detectada diferença estatística (Figura 4.11.B). Três doadores tiveram aumento superior a 20% para as taxas detectadas para DENV-2 e cinco para FAVac.



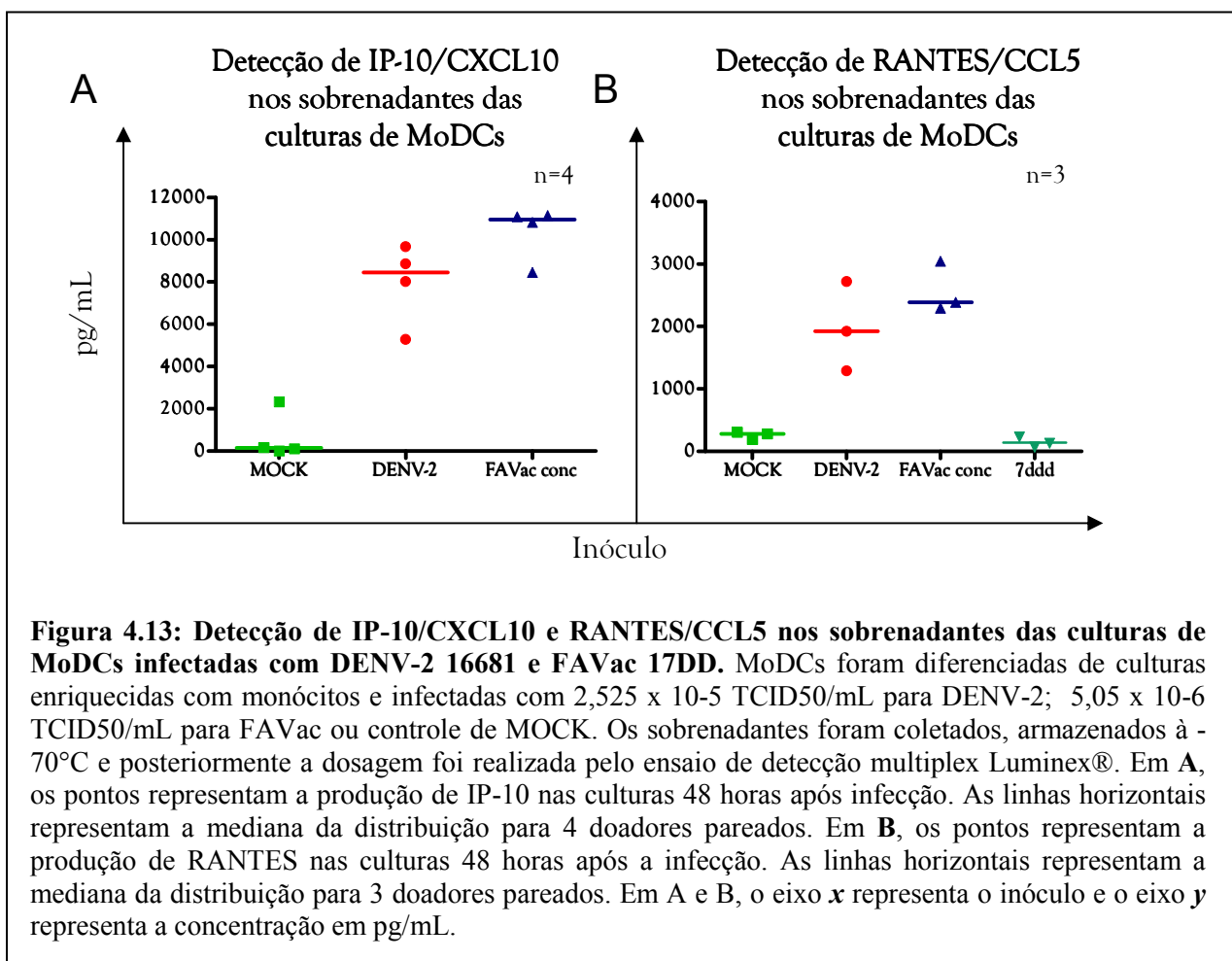
A produção de MCP-1/CCL2 (Figura 4.12.A) foi detectada em quatro doadores, sendo considerada similar entre MOCK e meio de cultura (N=2). A indução de MCP-1 teve mediana de 377,0 pg/mL para as culturas inoculadas com MOCK e de medianas 449,9 pg/mL e 840,2

pg/mL para DENV-2 e FAVac, respectivamente. A mediana das taxas pela indução flavivírus sobre MOCK foi superior para o FAVac com mediana de 3,28, comparando com o DENV-2 (mediana 1,23). Três doadores apresentaram aumento de mais de 100% para o FAVac e nenhum aumento de 100% para os sobrenadantes de DENV-2 sobre o MOCK (Figura 4.12.B), sugerindo uma tendência à maior produção de MCP-1 pelo vírus vacinal.



A produção de IP-10/CXCL10 (Figura 4.13.A) foi detectada para quatro doadores. Também não observamos diferenças entre a produção de IP-10 induzida por MOCK ou meio de cultura (N=2; 1253,0 e 1869,0 pg/mL; respectivamente). Detectamos uma mediana de 145,4 pg/mL para as culturas incubadas com MOCK, enquanto essa produção foi maior nas culturas infectadas com DENV-2 (mediana 8.447,0 pg/mL) e FAVac (mediana 10.958,0 pg/mL). Três dos quatro doadores tiveram produção de IP-10 maior nas culturas infectadas com FAVac em relação ao DENV-2.

Os valores de produção de RANTES/CCL5 (Figura 4.13.B) tiveram mediana de 278,6 pg/mL para as culturas incubadas com MOCK e 130,7 pg/mL nas culturas inoculadas com meio de cultura. Já as culturas infectadas com DENV-2 e FAVac tiveram medianas 1.924,0 e 2.387,0 pg/mL, respectivamente. Para todos os três doadores testados, a produção de RANTES foi maior nas culturas infectadas com FAVac quando comparadas ao DENV-2.



Resumindo, as seguintes citocinas foram detectadas após a infecção de MoDCs com um dos dois flavivírus: TNF- α , IFN- α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, IP-10, IL-10 e o fator IL-1Ra.

Encontramos um pico de produção de TNF- α em 48 horas após a infecção nas culturas infectadas pelos flavivírus, em que o DENV-2 induziu maior e significativa produção da

citocina frente ao FAVac. O TNF- α induzido pelas MoDCs infectadas foi correlacionado positivamente com a expressão de CD38 nas culturas infectadas pelos flavivírus. O FAVac induziu maior e significativa produção de IFN- α pelas MoDCs, tendência observada também para as culturas infectadas com FAVac em dose equivalente ao DENV-2. A taxa TNF- α /IFN- α das culturas infectadas confirma as diferenças encontradas acima. A produção de IL-6 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as culturas infectadas com os flavivírus.

O receptor solúvel anti-inflamatório IL-1Ra foi induzido em níveis semelhantes em culturas infectadas com ambos os vírus. Foi encontrada uma correlação inversa dos níveis desse fator com a detecção de antígeno viral nas MoDCs 24 horas após infecção com DENV-2, o que não ocorreu para FAVac. Também não encontramos diferenças na produção de IL-10 pelas culturas infectadas, embora uma correlação positiva desta citocina com a produção de IL-1Ra tenha sido calculada.

As quimiocinas MIP-1 β , MCP-1, RANTES e IP-10 não foram produzidas com diferenças estatisticamente significantes em relação ao FAVac, porém MCP-1, RANTES e IP-10 apresentaram tendências marcantes a uma maior produção de pelas culturas infectadas com FAVac comparadas a produção induzida pelo DENV-2.

5. DISCUSSÃO

Com a ampliação dos conhecimentos sobre os mecanismos do sistema imunológico gerados a partir das infecções, têm sido elucidadas as respostas aos flavivírus. Já é um consenso que a patologia dessas viroses envolva mecanismos de uma resposta imunológica exacerbada. Tanto durante uma infecção natural por dengue ou febre amarela, quanto durante a vacinação, a porta de entrada é através da derme, sendo que a replicação do DENV *in vitro* tem sido demonstrada em diferentes linhagens celulares primárias, como células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. Wu e cols. foram os primeiros a demonstrar a replicação do DENV-2 *in vivo* em células de Langerhans [59], indicando a importância dessa população celular para a resposta imunológica ao vírus; portanto os primeiros eventos que ocorrem na interação dos vírus com as células dendríticas podem definir o destino ou o curso da infecção e da doença. A infecção de células dendríticas primárias *in vitro* possibilita o entendimento das interações dos vírus com suas células alvo, em nível da produção de mediadores imunológicos, da ativação das vias intracelulares de sinalização e de outros efeitos do DENV.

As células dendríticas possuem papel crucial de iniciação da resposta imunológica, pois através da apresentação de antígenos e da produção de citocinas, ajudam a definir o tipo de resposta a ser tomada pelo organismo mediante infecções [194]. Essa população celular representa menos de 1% dos leucócitos do sangue periférico, sendo trabalhoso e de alto custo seu isolamento direto. Já foram descritos vários protocolos de geração de DCs *in vitro*. De acordo com os precursores e as citocinas utilizadas para diferenciação, são obtidas diferentes populações de DCs. O precursor mais utilizado é o monócito CD14⁺ do sangue periférico [194]. Vários coquetéis de citocinas foram descritos, sendo que o protocolo mais difundido de obtenção de DCs utiliza GM-CSF e IL-4 para diferenciação e foi usado neste estudo [266]. As DCs geradas por este protocolo são designadas MoDCs (do inglês *monocyte-derived dendritic cells*) e fenotipicamente se assemelham às DCs dermais [267]. O GM-CSF é responsável pela indução da expressão de CD1a nos monócitos [268]; a IL-4 induz expressão de DC-SIGN [269] e apresenta um efeito inibidor sobre a diferenciação de macrófagos [270]. Nosso modelo de diferenciação de MoDCs *in vitro* foi considerado eficiente, pois apresentou células com reduzida expressão do marcador CD14, característico de monócitos, a intensa expressão de DC-SIGN e células positivas para o marcador CD1a.

O processo de diferenciação por adição de GM-CSF e IL-4 gera células dendríticas imaturas, ou seja, possuidoras de grande atividade fagocítica e processamento antigênico [267]. Em um experimento preliminar, confirmamos o fenótipo imaturo das células diferenciadas, através da adição de LPS (indutor clássico de maturação) e também de IFN- γ . As MoDCs geradas demonstraram a capacidade de apresentação de antígenos, pois quando ativadas, expressaram os marcadores fenotípicos de maturação estudados, com altos níveis de

HLA-DQ,DP,DR e níveis mais moderados de CD80, conforme verificado por outros autores [271].

Os flavivírus estudados – DENV-2 e FAVac – são capazes de infectar células dendríticas diferenciadas de monócitos, assim como observado por outros grupos [45, 59]. Escolhemos esses vírus por serem de cultivo usual em laboratório e *in vivo* apresentam manifestações clínicas distintas, embora ambos desencadeiem uma imunidade duradoura. Achamos que seria interessante identificar as diferenças e semelhanças entre eles.

A citometria de fluxo é uma metodologia adequada para detecção da replicação viral nas células alvo e recentemente também foi utilizada como um método rápido de titulação de massas virais, além dos tradicionais e demorados métodos de unidade formadoras de placas (PFU/mL) e ensaios de diluição seriada (TCID₅₀) [272]. Em nosso estudo observamos uma grande variabilidade nas células positivas para o antígeno viral, principalmente do DENV. Essa variabilidade já foi observada por outros membros da nossa equipe em infecções *in vitro* de monócitos humanos [120] e por outro grupo em MoDCs [273]. Provavelmente, a variabilidade não decorre de problemas com a reprodutibilidade experimental, e sim dos polimorfismos genéticos dos doadores humanos das PBMLs utilizadas, induzindo respostas aos vírus de intensidades variadas, resultando na maior ou menos facilidade de replicação do vírus.

Para comparar ambas as cepas virais, optamos por titular as massas virais pela metodologia de ensaio de diluição seriada, pois o DENV-2 16681 apresenta a formação de placas indefiníveis, dificultando o cálculo do título por unidade formadoras de placas. Observamos que o FAVac infectando em doses (TCID₅₀/mL) equivalentes ao DENV-2 exibe expressão reduzida de antígenos virais em relação ao DENV-2, sugerindo uma virulência reduzida do FAVac. Resultados semelhantes foram encontrados por Deauvieau e cols. (2007) para a vacina 17D-204 (Stamaril[®], Sanofi Pasteur), que não detectou replicação viral para o FAVac quando inoculado na mesma multiplicidade de infecção (MOI) que o DENV-2 [189]. Entretanto, quando aumentamos a dose do vírus vacinal, detectamos um aumento na taxa de células positivas, o que aponta a infecção dose-dependente, também observada por Barba-Spaeth e cols. (2005) [45]. Em média, a dose concentrada inoculada de FAVac foi capaz de infectar as MoDCs em taxas semelhantes ao DENV-2. Por limitações na metodologia de obtenção de células humanas, tivemos que optar por uma das diluições do FAVac. A dose concentrada foi escolhida, pois demonstrou taxas de infecção e pico de replicação semelhantes aos do DENV-2. Esse trabalho foi inovador ao demonstrar a infecção de células dendríticas com o vírus vacinal brasileiro.

Após encontrar os vírus, as células dendríticas exibem diversas modificações fenotípicas que as capacitam para apresentação de peptídeos antigênicos para as células T. Durante este processo, o reconhecimento dos antígenos pelos PRRs induz a expressão de diversos marcadores de superfície e produção de moléculas solúveis. Esses fatores são cruciais para a polarização da resposta de células T efetoras.

Relatos no que se trata de inibição na maturação e ativação das MoDCs frente infecção pelo DENV-2 são encontrados na literatura. Várias equipes relatam que MoDCs positivas para o antígeno viral (infectadas) tem menor expressão de moléculas de coestimulação como CD83, CD86 e CD80 [74, 258]. Recentemente, Nightingale e cols. (2008) observaram que as MoDCs infectadas com DENV-2 tem maior expressão da molécula PD-L2 e de MHC classe II; e menor expressão de PD-L1, CD80, CD86 e MHC classe I quando comparadas as MoDCs *bystander* (negativas para o antígeno viral mediante presença do vírus na cultura) [133]. Entretanto, Deauvieu e cols. (2007) observaram a expressão similar de CD80, CD83 e CD86 nas MoDCs infectadas e *bystanders*, assim como Sanchez e cols. (2006) [128, 189]. Foi descrito que o vírus vacinal é capaz de induzir maturação/ativação de MoDCs estimuladas com o YF17D [187, 189], sendo que ambas populações MoDCs infectadas ou *bytanders* exibiram expressão similar no que se trata das moléculas CD80 e CD86 [188].

Em nosso trabalho, observamos a expressão da molécula de superfície CD38 em MoDCs frente infecção pelos flavivírus. Essa molécula de coestimulação é expressa em monócitos do sangue periférico [274]. Durante a diferenciação em células dendríticas imaturas, a expressão é reduzida, sendo reexpressa em MoDCs maduras. O CD38 tem função enzimática e catalisa a síntese de ADP ribose cíclica, que é um segundo mensageiro potente para a liberação de cálcio citoplasmático, colaborando assim para a quimiotaxia das células. Além disso, a ligação ao seu correceptor CD31 desencadeia uma sinalização intracelular [275]. Fedele e cols. (2004) demonstraram que estímulos como LPS, IFN- γ e ligação de CD40 induzem a expressão de CD38. A ativação dessa molécula é dependente de NF- κ B e induz expressão de CD83 e secreção de IL-12 [275]. Frasca e cols. (2006) observaram que o bloqueio de CD38 em MoDCs, reduz a produção de IFN- γ por células T autólogas, afetando a polarização Th1 [210]. Recentemente, foi sugerido o escape viral através da inibição da maturação de MoDCs humanas infectadas com vírus respiratórios. A infecção pelos vírus parainfluenza humana tipo 3, metapneumovírus humano e vírus respiratório sincicial exibiram MoDCs infectadas cuja maturação era reduzida, mas recuperável após a estimulação com LPS, com exceção do primeiro vírus que não induziu a expressão de ARNm da molécula CD38 [276].

O presente trabalho é o primeiro a relatar a expressão dessa molécula de maturação/ativação durante a infecção celular com DENV-2 ou FAVac. Esses dados sugerem

que a expressão de certos marcadores de maturação/ativação pode ser diferencial de acordo com a população de MoDCs infectadas pelo DENV-2 e também de acordo com a cepa viral utilizada. Neste trabalho não foi possível separar as populações infectadas e *bystanders* para cada flavivírus, o que também não descarta a hipótese da expressão diferencial em ambas populações. Testes de citometria de fluxo com marcação dupla para antígeno viral e marcador CD38 podem elucidar se ambas populações (antígeno viral positivas ou não) expressam a molécula de maturação. Mais uma vez devido à dificuldade de obtenção de células humanas, não foi possível utilizar culturas inoculadas com LPS como controle positivo da expressão de CD38. Além disso, necessitamos realizar testes para eliminar a possibilidade do aumento da expressão de CD38 ser causada por contaminação de LPS nas massas virais. Assim, podemos sugerir que a expressão de CD38 nas culturas infectadas pode contribuir na construção de uma resposta do tipo Th1 para ambas cepas virais, uma vez que não observamos diferenças marcantes entre os vírus estudados.

A molécula de superfície OX40L também foi analisada durante este estudo. Vários autores correlacionam a sua expressão com a polarização de uma resposta do tipo Th2. Ohshima e cols. (1997) observaram que a ligação OX40L-OX40 estimula a produção do ARNm de IL-4 e produção de IL-13 pelas células T estimuladas. As DCs localizadas no trato gastrointestinal de camundongos produzem citocinas Th2, que é suprimida pela adição de anticorpos anti-OX40L [277]. Neste trabalho observamos que, independentemente do flavivírus analisado, as MoDCs expressaram o marcador, assim como as células inoculadas com MOCK. Ohshima e cols. (1997) não observaram a marcação em MoDCs imaturas, porém a expressão foi aumentada com a adição de CD40L solúvel na cultura. A diferença encontrada entre esses dois trabalhos pode ser relacionada às diferentes metodologias de análise das marcações. A diferença de expressão de OX40L entre as amostras inoculadas com MOCK e as cepas virais foi muito sutil, motivo pelo qual decidimos utilizar uma ferramenta de análise mais sensível descrita por Overton [278]. Essa metodologia leva em consideração as células de baixa fluorescência através da subtração das células consideradas negativas (controle de isotipo) das células consideradas positivas (amostras) nos histogramas da marcação. Entretanto, não podemos deixar de mencionar que esses dados serão mais bem analisados com a utilização de um controle positivo, como o CD40L solúvel. Assim, os dados obtidos apresentam uma queda na expressão de OX40L e aumento da expressão de CD38, sugerindo mais uma vez a tendência à estimulação de uma resposta Th1 por parte das culturas de MoDCs inoculadas com os flavivírus.

As culturas de MoDCs inoculadas com DENV-2 e FAVac foram capazes de produzir várias citocinas, em menores concentrações nas culturas controle. Observamos que o TNF- α

está significativamente aumentado nas culturas infectadas com DENV-2 em relação ao FAVac, enquanto que IL-6, IL-10 e IL-1Ra, também se encontraram estimuladas pelos dois vírus, embora não fossem detectadas diferenças marcantes entre eles. O IFN- α foi produzido em níveis mais elevados pelo vírus FAVac, ainda que inoculado em dose equivalente a usada pelo DENV-2. Ambos flavivírus induziram uma produção das quimiocinas MIP-1 β , MCP-1, RANTES e IP-10, com uma tendência a maior produção pelo FAVac, exceto para o MIP-1 β . Observamos uma alta variabilidade nos níveis de produção de cada citocina entre os doadores de PBML. Entretanto, quando analisamos a produção de citocinas em culturas inoculadas somente com meio de cultura, observamos que os níveis são semelhantes aos induzidos pelo MOCK. Sugerimos que esses fatores sejam decorrentes das características de cada doador, sendo que vários outros trabalhos também demonstraram essa variabilidade [133, 189].

A citocina pró-inflamatória TNF- α é frequentemente encontrada em soro de pacientes com FD/FHD [94-99] e altos níveis dessa citocina foram correlacionados com as manifestações hemorrágicas [100]. Os monócitos e os macrófagos são os produtores primários de TNF- α [279], que se apresenta na forma de molécula de superfície, sendo esta clivada por metaloproteinases de matriz e assumindo a forma solúvel biologicamente ativa. O TNF- α induz alterações fisiológicas que auxiliam no *clearance* de agentes patogênicos, através da ligação com seus receptores específicos, principalmente com o TNFR-I. Esse processo desencadeia o acúmulo de c-fos e NF- κ B no núcleo, a síntese de prostaglandina E2, a síntese de receptor de IL-2 e o aumento da citotoxicidade celular. Junto com a IL-1, o TNF- α aumenta a produção de proteínas de fase aguda. Sua atividade microbiana decorre da potencialização da função fagocítica de neutrófilos e macrófago, da indução da síntese de óxido nítrico e da atração de células polimorfonucleares e leucócitos para o local da inflamação. Apesar de não possuir uma função quimiotática, o TNF- α medeia esse recrutamento regulando a expressão de moléculas de adesão do endotélio ou sinalizando a liberação de peptídeos quimiotáticos e mediadores lipídicos [280, 281].

O TNF- α é considerado um mediador chave em algumas patologias sistêmicas agudas, como a sepses bacteriana e a malária cerebral, nas quais foram observadas correlações positivas entre a gravidade da doença e os níveis plasmáticos da citocina [282, 283]. O tratamento com anticorpos anti-TNF demonstrou-se eficaz em vários modelos animais de bacteremia e desafio com endotoxina. Entretanto, os testes de neutralização do TNF em sepses clínicas demonstraram uma pequena redução da mortalidade [280]. O TNF- α também está relacionado com a patogenia em doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide. Nesse caso, a terapia de neutralização do TNF- α é considerada um sucesso [284]. Provavelmente, a cinética de ação do TNF- α difere entre as duas síndromes clínicas. Já na FD,

a liberação sistêmica de TNF- α pode ter papel similar ao relatado para sepsis. Um modelo murino de hemorragia causada por DENV correlaciona a presença de TNF- α com as manifestações hemorrágicas em tecidos subcutâneos, o que não foi observado em animais deficientes de TNF (TNF^{-/-}) [285]. Assim, ao mesmo tempo em que o TNF- α exerce uma proteção contra os patógenos, ativando os leucócitos; a sua liberação sistêmica pode ativar o endotélio, resultando na permeabilidade endotelial e no extravasamento plasmático, acarretando o choque hipovolêmico.

Em nosso modelo *in vitro*, observamos uma maior produção de TNF- α pelo vírus patogênico DENV-2, o que corrobora o papel dessa citocina na imunopatogenia da doença. Vários outros grupos relataram a produção de TNF- α pelas culturas de MoDCs infectadas com DENV-2 [133, 257, 265]. Nightingale e cols. (2008) relataram que MoDCs antígeno positivas para DENV são altamente positivas para TNF- α em relação as MoDCs *bystanders*, resultado também encontrado para Sanchez e cols. (2006) comparando com uma cepa atenuada de DENV-2.

O vírus vacinal (FAVac) também foi capaz de induzir a produção da citocina pró-inflamatória (TNF- α) pelas MoDCs, mas devemos destacar que mesmo na dose mais concentrada, o vírus vacinal não induziu uma produção em níveis elevados dessa citocina se comparada ao DENV-2. Assim como nosso trabalho, Querec e cols. (2006) e Deauvieu e cols. (2007) observaram a produção de TNF- α por MoDCs inoculadas com FAVac. Uma correlação positiva entre a expressão de CD38 e a produção de TNF- α foi encontrada para os flavivírus. Naturalmente seguindo a correlação, podemos argumentar que a produção de CD38 tenha sido maior nas culturas infectadas com DENV-2 em comparação a FAVac, uma vez que o TNF- α apresentou-se maior nas culturas inoculadas com DENV-2. Entretanto, o valor de *p* da correlação encontrada está no limite da significância e o número de doadores utilizados é pequeno. Assim, sugerimos apenas que a citocina tenha papel na maturação das células inoculadas com as cepas virais. O TNF- α por si só é indutor da maturação das MoDCs, e de acordo com Dejnirattisai e cols. (2008), a maturação das MoDCs inoculadas com DENV-2 é bloqueada com a adição de anticorpos anti-TNF- α e/ou anti-IFN- α . Um aumento nos níveis de TNF- α foi encontrado para primovacinados [286, 287]. Como citado anteriormente, o TNF- α é crucial para imunidade inata. A indução de TNF- α por ambas cepas virais colaboraria para a maturação das células dendríticas frente a infecção e *in vivo* ativar o endotélio atraindo células da imunidade para o local da infecção. Entretanto, a produção exacerbada pode ser um fator preditivo de gravidade.

A citocina IFN- α é um fator antiviral que pode agir de maneira autócrina e parácrina. A ligação desse fator solúvel ao seu receptor desencadeia a transcrição de genes como a

interferência na tradução e edição do RNA mensageiro viral e, ainda, a ação enzimática direta sobre este RNA [231]. Conforme citado no parágrafo acima, o IFN- α é uma molécula importante para a maturação de MoDCs [288], sendo que os monócitos humanos diferenciados em DCs na presença de IFN tipo I e GM-CSF exibem uma polarização do tipo Th1, podendo migrar para sítios de inflamação em resposta a IP-10 [289]. Em nosso estudo, observamos uma maior capacidade das culturas infectadas com FAVac em produzir IFN- α em relação ao DENV-2. Na literatura, já foi descrita a produção dessa citocina por MoDCs inoculados com ambos flavivírus [74, 187], mas nenhum trabalho relatou essas diferenças entre os dois flavivírus.

Em geral, a indução da síntese do IFN- α/β ocorre por dois caminhos: o vírus e seus produtos são reconhecidos pela célula através dos PRRs que induzem uma pequena e importante produção dessas citocinas, pois através da ligação dos IFN tipo I com seus receptores extracelulares, ocorre uma segunda produção das citocinas. A ativação de IRF-7 (do inglês *interferon regulatory factor-7*) é a responsável pelo aumento na transcrição dos genes de IFNs pelas células, através de retroalimentação positiva [290, 291].

Estudos anteriores demonstraram que o DENV escapa do sistema imunológico através da inibição da via do IFN- α assim como outros flavivírus [135, 136]. O DENV inibe a ação do IFN- α , mas não do IFN- γ , através da diminuição da expressão do STAT-2 (*Signal transducer and activator of transcription*) [137, 138]. Munoz-Jordan e cols. demonstraram que a proteína não estrutural do DENV - NS4B - inibe a expressão dos ISREs (*interferon stimulated response elements*) e que a co-expressão de NS4A e NS4B aumenta essa inibição [41].

A baixa produção de IFN- α pelas culturas de MoDCs inoculadas com DENV-2 em relação ao FAVac sugere que a inibição da via dependente de IRF-7 exercida pelo DENV-2, evitaria o rápido controle da infecção. Alternativamente, este atraso poderia ser exacerbado durante as infecções sequenciais de Dengue, em que o ADE ativaria os Fc γ R, induzindo a produção de IL-10, que por sua vez ativa a transcrição do supressor de sinalização de citocinas (do inglês *suppressor of cytokine signalling* – SOCS). Este supressor interfere na via JAK/STAT, bloqueando a ação do IFN- α , ou seja, apesar de ser produzido, IFN- α não estaria sendo efetivo no controle da infecção do DENV [292].

Sugestivamente, o FAVac não teria a interferência na via de retroalimentação da síntese dos IFNs, explicando a sua produção em maiores quantidades que o DENV-2. Ainda, o IFN- α é importante ativador policlonal de células B induzindo respostas primárias humorais robustas, caracterizadas por uma mudança isotípica IgG2a (resposta Th1) e pela proteção frente desafio quando administrado juntamente com a vacina contra influenza [288]. A

citocina IFN- α induz a produção de IFN- γ e aumento do marcador de ativação CD69 pelas células NK, estimulando a função citotóxica destas células que é fundamental para a resposta antiviral [232].

Foi relatado que as maiores taxas de células NK [63] e de DCs plasmacitóides (principal produtora de IFN- α) [145] foram correlacionadas com o Dengue brando e com um bom prognóstico da doença. Ainda, em modelo animal, camundongos AG129 deficientes em receptores de IFN- α , β e γ , quando infectados com DENV-2 exibem viremia transitória, o que não acontece nas cepas selvagens [293]. A vacinação com FAVac cepa 17D-204 foi capaz de induzir o aumento de genes que regulam a produção de IFN tipo I [185]. Sendo assim, nossos resultados sugerem que o IFN- α possa ter um papel importante na construção da imunidade vacinal.

O IFN- α pode induzir a maturação das células dendríticas infectadas juntamente com o TNF- α , capacitando-as para a apresentação eficiente dos antígenos virais, enquanto torna as células vizinhas refratárias a infecção. No caso do FAVac, esse processo seria facilitado pela baixa virulência do vírus vacinal. Já no caso do DENV-2 e evidenciado pela taxa TNF- α /IFN- α , a maior tendência na produção do mediador inflamatório TNF- α pelo DENV-2 e menor produção de IFN- α pode estar desequilibrando ou atrasando o *clearance* viral.

A citocina IL-6 é uma molécula de funções pleiotrópicas e auxilia na regulação da reatividade imunológica, na resposta de fase aguda, na inflamação, na oncogênese e na hematopoiese. Trabalhos científicos correlacionam a citocina IL-6 com a gravidade da FD/FHD [101-103]. Autores relatam que MoDCs infectadas são capazes de produzir IL-6, em resposta ao DENV-2 [123, 128], quanto ao FAVac 17D-204 [188, 189]. Essa produção foi considerada semelhante entre os vírus quiméricos (proteína envelope do DENV inserida no ADN circular do vírus vacinal) e o vírus vacinal FAVac, sendo que os DENV parentais eram produtores menos eficientes de IL-6 [189]. Em nosso estudo, não observamos diferenças marcantes entre a produção de IL-6 induzida pelos flavivírus. Podemos sugerir que outros tipos celulares estejam induzindo a produção diferencial entre os flavivírus, ou que a produção de IL-6 por células dendríticas não seja crucial para a imunidade/patogenia. O papel da IL-6 também pode ser ligado à diferenciação de linfócitos B, proliferação de linfócitos e diferenciação de células T citotóxicas.

O receptor solúvel antagonista da IL-1 (IL-1Ra) é anti-inflamatório e possui um papel imunomodulador em células dendríticas. Ele age competindo pelo receptor celular de IL-1 com a citocina IL-1, que é ativadora de DCs [233]. Células dendríticas humanas estimuladas com IL-1 e CD40L produzem IL-1Ra, diminuindo a produção de IL-12 [294]. MoDCs infectadas com HIV e, em seguida, estimuladas com LPS exibem produção reduzida de IL-

1Ra [295]. Pinto e cols. encontraram níveis aumentados de IL-1Ra em pacientes com FD em apenas 16% dos 34 pacientes brasileiros analisados [97]. Suharti e cols. observaram em pacientes com choque da Dengue uma correlação entre IL-1Ra e marcadores de coagulação [104] e associaram o marcador à mortalidade [112]. Em voluntários primovacinaados com FAVac RKI, os níveis de IL-1Ra aumentaram em relação ao controles não vacinados [296]. Nesse trabalho, não encontramos diferenças entre a produção de IL-1Ra induzida pelos dois flavivírus. Observamos também que apenas alguns doadores exibiram produção marcante frente ao MOCK. Entretanto, uma correlação inversa foi encontrada entre a detecção de antígenos virais do DENV-2 nas células infectadas e a produção de IL-1Ra nessas culturas. Podemos sugerir que de alguma maneira a presença desse mediador solúvel possa interferir na replicação viral. Essa correlação não foi observada para FAVac, indicando uma diferença na suscetibilidade replicativa entre os flavivírus estudados. A função do IL-1Ra durante a febre da dengue ainda precisa ser melhor esclarecida.

A IL-10 também é imunomoduladora e diminui a expressão dos marcadores de maturação das DCs, diminuindo assim a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-12; e a expressão de moléculas coestimulatórias [204]. Azeredo e cols. encontraram uma correlação entre os níveis de IL-10 e a trombocitopenia em pacientes [111]. Em culturas de MoDCs infectadas com DENV-2, Palmer e cols. (2005) observaram a produção de IL-10 e demonstraram a baixa estimulação de células T, enquanto Deauvieu e cols. (2007) não encontraram IL-10 para DENV-2 e baixas concentrações para FAVac. Em nosso trabalho, observamos uma baixa produção de IL-10 para ambos flavivírus. Diferenças metodológicas e nas cepas virais utilizadas poderiam explicar essa discrepância com relação a produção de IL-10. Uma correlação positiva da IL-10 com a produção de IL-1Ra foi encontrada, sugerindo que ambos flavivírus induzem a expressão de baixos níveis de citocinas antiinflamatórias em comparação ao MOCK. De acordo com a correlação, a IL-10 poderia inibir a inflamação pela indução da produção de IL-1Ra por macrófagos [297]. Kwan e cols. (2008) observaram que macrófagos dermais com expressão constitutiva de IL-10 são refratários a replicação pelo DENV-2. Portanto, a maturação/ativação das células dendríticas não seria afetada pela produção de IL-10 induzida pelos flavivírus. A baixa expressão de IL-10 nas culturas infectadas está de acordo com o aumento da expressão de CD38, uma molécula de maturação, das células infectadas, pois a citocina é caracteristicamente moduladora de maturação e produção de citocinas pró-inflamatórias dessa população celular.

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que direcionam o fluxo celular de maneira homeostática ou induzida. Como citado anteriormente, as DCs mudam o perfil de produção desses mediadores e expressão de seus receptores durante o processo de maturação. Durante o

processo de infecção viral aguda, as quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES e CXCL3/IP-10 são preferencialmente detectadas independente do vírus, local do órgão ou fase da infecção [240].

De uma maneira geral, a quimiocina MCP-1 foi correlacionada com a gravidade [114] e com trombocitopenia e hipotensão [107] em pacientes com FD/FHD. Entretanto, dados preliminares não publicados em nosso laboratório apontam maior produção de MCP-1 em pacientes com quadros mais brandos. A quimiocina MIP-1 β foi considerada como bom prognóstico frente infecção por DENV [107]. Ainda, a IP-10 foi produzida por pacientes com FD [113] e está aumentada nos casos de FHD [273]. A quimiocina RANTES foi descrita como inalterada em pacientes com FD/FHD hospitalizados em relação aos controle [109]. E ainda, em nosso laboratório, foram observados maiores níveis de células T expressando o receptor de RANTES (CCR5) em casos brandos.

Um estudo comparativo entre um voluntário primovacinado e casos de reação adversa a vacinação com FAVac demonstrou intensa detecção de RANTES e moderada de MCP-1 no primovacinado, enquanto essa detecção foi fraca para RANTES e intensa para MCP-1 em um caso fatal de vacinação [298]. Contrariando esse trabalho, Pulendran e cols. observaram que mutações nos genes codificadores de CCR5 e RANTES, resultando em polimorfismos, foram encontrados em um paciente com reação adversa a vacinação, sugerindo assim que as mutações alterariam o eixo CCR5-RANTES [299]. Em um outro trabalho, 15 primovacinos apresentaram um aumento significativo de IP-10 após a vacinação com FAVac, sugerindo um papel importante dessa molécula para a indução de uma resposta protetora eficiente e controladora da infecção.

Em nosso trabalho observamos a produção de MCP-1, MIP-1 β , RANTES e IP-10 pelos flavivírus de maneira altamente variável entre os doadores. A quimiocina MIP-1 β foi induzida em apenas alguns doadores, e não observamos diferenças entre a capacidade de produção entre ambos flavivírus. Por ser preditivo de bom prognóstico para o DENV, esperaríamos que o FAVac fosse maior indutor, porém isso não ficou evidenciado, os dois vírus devem possuir algumas vias de indução diferentes em suas respostas. Rababert e cols. observaram que uma cepa atenuada de DENV-2 foi capaz de induzir expressão de ARNm de MIP-1 β de maneira semelhante a cepa selvagem em PBMCs humanos [300]. Nightingale e cols. (2008) também demonstraram a produção de MIP-1 β por MoDCs infectadas por DENV-2. Não é do nosso conhecimento relato algum sobre a produção de MIP-1 β por MoDCs inoculadas com FAVac e também nenhum que o compare com a produção induzida pelo DENV-2. Assim, esse trabalho demonstrou pela primeira vez a indução dessa quimiocina frente infecção pelo vírus vacinal da febre amarela.

As células endoteliais são capazes de produzir MCP-1 frente a uma estimulação por anticorpos contra NS1, resultando assim na ativação do endotélio [301]. Deauvieu e cols. observaram que quimeras DENV-FAVac foram capazes de induzir a produção de MCP-1 por MoDCs em níveis similares a FAVac e maiores níveis que as cepas parentais DENV [189], de acordo com nossos resultados. Mastócitos [302], células endoteliais [303], linhagens hepáticas [127] e células dendríticas [133] são capazes de produzir RANTES frente infecção por DENV e células endoteliais induzem maior produção de RANTES frente a infecção por FAV selvagem quando comparado a cepa vacinal [304], ao contrário do observado *in vivo*. Observamos que ambos os flavivírus foram capazes de induzir a expressão de RANTES no nosso sistema de estudo. Podemos postular que as quimiocinas produzidas pelas MoDCs frente infecção pelos flavivírus estejam sinalizando a atração de monócitos (no caso do MCP-1), células NK (MIP-1 β) e células de perfil Th1 (RANTES) para o local da inflamação. Essas populações celulares são cruciais para o controle da infecção e a geração de uma imunidade duradoura.

A literatura relata que a molécula IP-10 e seu receptor CXCR3 contribuíram para a resistência a infecção com DENV, em um modelo murino [305], e a sua indução ainda foi correlacionada com a ativação e infiltração de células NK no fígado desses animais [306]. Observamos a produção de IP-10 por MoDCs infectadas com DENV-2, assim como Nightingale e cols. (2008). Esse grupo também observou que MoDCs *bystanders* tem maior expressão de IP-10 do que as infectadas, sugerindo o papel protetor dessa quimiocina. Ainda, o IFN- α participa na indução da produção de IP-10 pelas MoDCs infectadas. Essa população também é capaz de induzir a produção de IP-10 frente infecção com FAVac [188]. Assim, podemos sugerir que a maior tendência a produção de IP-10 pelas culturas de MoDCs infectadas com FAVac seja em razão da maior produção de IFN- α por este flavivírus. A IP-10 pode estar participando na maior atração de células Th1 e NK, ambas populações com CXCR3, colaborando para a redução da carga viral no local da infecção.

Todas as quimiocinas foram tendenciosamente mais aumentadas nas culturas infectadas com FAVac, o que poderia ser explicado também pelo maior número de partículas virais inoculadas. Entretanto, alguns doadores (2 de 4 testados) exibiram concentrações de IP-10 e MCP-1 maiores que o DENV-2, quando as MoDCs foram inoculadas com FAVac em dose equivalente ao DENV-2, sugerindo que a produção de citocinas seja dependente do doador em questão e neste caso não da carga viral inoculada. De uma maneira geral, ambos flavivírus exibiram perfil de indução de citocinas semelhantes, com exceção do TNF- α e IFN- α . Ambos os flavivírus também foram capazes de aumentar a expressão de CD38 e diminuir a expressão de OX40L. Sugerimos aqui o importante papel do IFN- α em controlar a infecção pelos

flavivírus principalmente na geração da imunidade vacinal e corroboramos o papel do TNF- α na contribuição do desenvolvimento da imunopatologia frente infecção pelo DENV-2.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O DENV-2 é apresentado-se mais virulento que o FAVac, se considerarmos as taxas de células infectadas durante as cinéticas de infecção. Foi demonstrada a sua alta capacidade de infecção (em doses equivalentes) e produção de TNF- α no sistema *in vitro* de células dendríticas diferenciadas de monócitos periféricos humanos. Também observamos que a infecção do vírus vacinal é dose dependente.
- Este trabalho é pioneiro em apresentar alterações imunológicas em MoDCs infectadas com a vacina brasileira contra febre amarela, sendo que algumas alterações não haviam sido também observadas para o DENV.
- Relatamos pela primeira vez que as células infectadas com os flavivírus foram capazes de alterar a expressão do marcador de maturação aumentando CD38 e diminuindo a expressão do marcador OX40L após a infecção das MoDCs com os dois flavivírus, sugerindo uma tendência a polarização Th1 dessas células.
- O vírus da Febre Amarela vacinal induziu altas concentrações de IFN- α e baixas de TNF- α , sugerindo que estas condições possam estar envolvidas na geração ótima da imunidade vacinal, contrapondo-se às altas concentrações de TNF- α e baixas de IFN- α induzidas pelo DENV.
- Observamos a produção das quimiocinas MIP-1 β , MCP-1, RANTES e IP-10 em resposta a ambos os flavivírus, sendo a primeira vez que a produção de MIP-1 β é relatada para a FAVac.

Pretendemos ainda complementar esse trabalho realizando a quantificação do ARNm viral nos sobrenadantes das culturas infectadas e controles, utilizando um sistema de detecção para os dois flavivírus ao mesmo tempo, visando confirmar os dados da citometria de fluxo. Além disso, pretendemos estudar mais marcadores de ativação como CD83, CD86, CD80 e outros nas populações de MoDCs inoculadas com ambos flavivírus (estudando tanto as células infectadas quanto as *bystanders*).

Com o intuito de aprimorar o conhecimento das semelhanças e diferenças desses vírus, várias abordagens ainda poderão ser tomadas; temos o intuito de estudar as vias de transdução de sinal e de ativação durante a infecção viral. Ensaios de intervenção tais como a neutralização imunológica por anticorpos avaliando os fatores IFN- α e TNF- α ou por competição com peptídeos análogos/antagônicos adicionados às culturas infectadas deverão ser feitos visando maior esclarecimento da ação dessas citocinas na infecção *in vitro*. Além disso, pretendemos realizar co-marcações para antígeno viral e citocinas, objetivando a separação das populações de células dendríticas de acordo com esses parâmetros.

Este modelo poderá ainda ser utilizado para avaliar o potencial virulento de outros flavivirus, em especial os selvagens, isolados de pacientes permitindo o reconhecimento do potencial patogênico das cepas virais em questão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*. 2004 Oct;80(948):588-601.
- [2] Halstead SB. Global epidemiology of dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1990 Dec;21(4):636-41.
- [3] Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G, eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB International 1997:1-22.
- [4] Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jul;11(3):480-96.
- [5] Ministério-da-Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue. Janeiro a Novembro de 2008. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_janeiro_novembro.pdf. 2009.
- [6] Gubler DJ. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;27(5):319-30.
- [7] Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. *P R Health Sci J*. 1987 Aug;6(2):107-11.
- [8] Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990 Feb;174(2):479-93.
- [9] Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983 Jan-Feb;25(1):53-4.
- [10] Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986 Apr-Jun;81(2):245-6.
- [11] Vasconcelos PF, Mota K, Straatmann A, Santos-Torres S, da Rosa AP, Tavares Neto J. [A dengue epidemic in Ipujiara and Prado, Bahia. A seroepidemiologic survey]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000 Jan-Feb;33(1):61-7.
- [12] Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990 Apr-Jun;85(2):253.
- [13] Vasconcelos PF, Lima JW, da Rosa AP, Timbo MJ, da Rosa ES, Lima HR, et al. [Dengue epidemic in Fortaleza, Ceara: randomized seroepidemiologic survey]. *Rev Saude Publica*. 1998 Oct;32(5):447-54.
- [14] Travassos da Rosa AP, Vasconcelos PF, Travassos Da Rosa ES, Rodrigues SG, Mondet B, Cruz AC, et al. Dengue epidemic in Belem, Para, Brazil, 1996-97. *Emerg Infect Dis*. 2000 May-Jun;6(3):298-301.
- [15] De Simone TS, Nogueira RM, Araujo ES, Guimaraes FR, Santos FB, Schatzmayr HG, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004 Sep;98(9):553-62.
- [16] Secretaria-de-Vigilância-em-Saúde. Dengue - Boletim da Semana 14/2005. 2005 [cited 10/05/2006]; Available from:
- [17] Siqueira JB, Jr., Martelli CM, Coelho GE, Simplicio AC, Hatch DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jan;11(1):48-53.
- [18] Secretaria-de-Vigilância-em-Saúde. Dengue - Boletim da Semana 14/2005. 2005 [cited; Available from: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Boletim%20Semana%2040%202005.pdf>
- [19] Secretaria-de-Vigilância-em-Saúde. Dengue - Boletim da Semana 52/2006. 2006 [cited; Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_dez2006.pdf
- [20] O.P.A.S. Number of Reported Cases of Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) in the Americas, by Country. 2008 [cited 2008 02/02/2009]; Available from: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2008.pdf>
- [21] Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annual review of microbiology*. 2008;62:71-92.
- [22] Solomon T, Mallewa M. Dengue and other emerging flaviviruses. *J Infect*. 2001 Feb;42(2):104-15.
- [23] Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*. 2004 Dec;10(12 Suppl):S98-109.

- [24] Monath TP, Heinzz FX. Flavivirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology*. 3 ed. ed. Philadelphia: Raven Publishers 1996:961-1034.
- [25] Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet*. 2008 Feb 9;371(9611):500-9.
- [26] Simpson DH. Arboviruses. In: Cook G, ed. *Manson's Tropical Diseases*. London: Saunders 1996.
- [27] Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Jan;3(1):13-22.
- [28] Diaz FJ, Black WCt, Farfan-Ale JA, Lorono-Pino MA, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. *Arch Med Res*. 2006 Aug;37(6):760-73.
- [29] Zhang C, Mammen MP, Jr., Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol*. 2005 Dec;79(24):15123-30.
- [30] Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*. 2003 May;3(1):19-28.
- [31] Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*. 2000 Apr;74(7):3227-34.
- [32] Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*. 1997 Sep;78 (Pt 9):2279-84.
- [33] Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*. 1994 Jan;75 (Pt 1):65-75.
- [34] Chang GJ. Molecular biology of dengue viruses. In: Gubler DJ, Kuno G, eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB International 1997:175-95.
- [35] Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*. 2004 Sep;12(9):1607-18.
- [36] Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008 Aug;11(4):369-77.
- [37] Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol*. 2003 Nov;10(11):907-12.
- [38] Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002 Mar 8;108(5):717-25.
- [39] Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem*. 2007 Mar 23;282(12):8873-82.
- [40] Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*. 2006 Sep;87(Pt 9):2605-14.
- [41] Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, et al. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol*. 2005 Jul;79(13):8004-13.
- [42] Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*. 2003 Jul;4(7):723-8.
- [43] Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Apr 7;197(7):823-9.
- [44] Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):23698-708.
- [45] Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med*. 2005 Nov 7;202(9):1179-84.
- [46] Miller JL, deWet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog*. 2008 Feb 8;4(2):e17.

- [47] Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol*. 1999 Apr;73(4):2650-7.
- [48] Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol*. 2004 May;149(5):915-27.
- [49] Kroschewski H, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 2003 Mar 30;308(1):92-100.
- [50] Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Res*. 2008 Oct;80(1):11-22.
- [51] Rothman AL. Viral pathogenesis of dengue infections. In: Gubler DJ, Kuno G, eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB International 1997:245-70.
- [52] Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol*. 1997 Jul-Aug;16(4):204-8.
- [53] Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*. 2004 Apr 15;189(8):1411-8.
- [54] Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology*. 2008 Jul 5;376(2):429-35.
- [55] Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WW, Rose RC, Schlesinger JJ, et al. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. 2008 Jan;80(1):134-46.
- [56] Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg*. 2000 Jul-Aug;63(1-2):71-5.
- [57] Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis*. 2005;5:64.
- [58] Bente DA, Rico-Hesse R. Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models*. 2006;3(1):97-103.
- [59] Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med*. 2000 Jul;6(7):816-20.
- [60] O.M.S. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases 2000 [cited 2006; Available from:
- [61] O.M.S. Dengue hemorrhagic fever diagnosis, treatment and control. In: OMS, ed. Geneva 1997.
- [62] Harris E, Videia E, Perez L, Sandoval E, Tellez Y, Perez ML, et al. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. 2000 Jul-Aug;63(1-2):5-11.
- [63] Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol*. 2006 Feb;143(2):345-56.
- [64] Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*. 2006 Jul 8;368(9530):170-3.
- [65] Kroeger A, Nathan MB. Dengue: setting the global research agenda. *Lancet*. 2006 Dec 23;368(9554):2193-5.
- [66] O.M.S. Experts propose simplified system of dengue classification. 2008 [cited 02/02/2009]; Available from: <http://www.who.int/tdr/svc/news-events/news/dengue-classification>
- [67] Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis*. 2006 Oct;19(5):429-36.
- [68] Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007 Sep;30(5-6):329-40.
- [69] Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):476-81.

- [70] Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg.* 1988 Mar;38(2):411-9.
- [71] Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;60:421-67.
- [72] Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Apr;40(4):444-51.
- [73] Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, et al. Dengue Virus (DV) enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. *J Infect Dis.* 2005 Aug 1;192(3):510-9.
- [74] Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol.* 2001 Apr;75(8):3501-8.
- [75] Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2008 Oct;225:300-13.
- [76] Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):2-9.
- [77] Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4738-47.
- [78] Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* 1999 Oct 23;354(9188):1431-4.
- [79] Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol.* 2005 Jan;79(2):853-9.
- [80] Pandey BD, Igarashi A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiol Immunol.* 2000;44(3):179-88.
- [81] Pandey BD, Morita K, Hasebe F, Parquet MC, Igarashi A. Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2000 Jun;31(2):266-72.
- [82] Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Sep;65(3):180-3.
- [83] Moraes MO, Da-Cruz AM, Kubelka CF, Lannes J, Quirico T. 28. Tropical Diseases In: Vanderbroeck H, ed. *Cytokine gene Polymorphisms in multifactorial conditions* London: CRC Press LLC 2006:413-30.
- [84] Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens.* 2004 Oct;64(4):469-72.
- [85] Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 Jul;67(1):102-6.
- [86] Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet.* 2005 Apr 17.
- [87] Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens.* 2002 Oct;60(4):309-18.
- [88] Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, White NJ, et al. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis.* 2001 Dec 1;184(11):1369-73.
- [89] Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med.* 2003 Jul;9(7):921-7.

- [90] Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol*. 2006 Mar 15;176(6):3821-9.
- [91] Bashyam HS, Green S, Rothman AL. Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *J Immunol*. 2006 Mar 1;176(5):2817-24.
- [92] Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 2001 Sep;8(5):377-88.
- [93] Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C. Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med J*. 1991 Jun;36(2):63-5.
- [94] Kuno G, Bailey RE. Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994 Apr-Jun;89(2):179-82.
- [95] Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Mar;48(3):324-31.
- [96] Chakravarti A, Kumaria R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res*. 2006 Jan;123(1):25-30.
- [97] Pinto LM, Oliveira SA, Braga EL, Nogueira RM, Kubelka CF. Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999 May-Jun;94(3):387-94.
- [98] Nguyen TH, Lei HY, Nguyen TL, Lin YS, Huang KJ, Le BL, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis*. 2004 Jan 15;189(2):221-32.
- [99] Kubelka CF, Borges PA, VonSydow FF, Lampe E. Analysis of tumor necrosis factor-alpha serum level in Brazilian patients with Dengue-2. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995 Nov-Dec;90(6):741-2.
- [100] Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignacio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, et al. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Feb;96(2):229-32.
- [101] Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Jan;74(1):142-7.
- [102] Avila-Aguero ML, Avila-Aguero CR, Um SL, Soriano-Fallas A, Canas-Coto A, Yan SB. Systemic host inflammatory and coagulation response in the Dengue virus primo-infection. *Cytokine*. 2004 Sep 21;27(6):173-9.
- [103] Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. 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*. 2001 Jul;65(1):70-5.
- [104] Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thrombosis and haemostasis*. 2002 Jan;87(1):42-6.
- [105] Restrepo BN, Ramirez RE, Arboleda M, Alvarez G, Ospina M, Diaz FJ. Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Nov;79(5):673-7.
- [106] Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001 Apr;30(3):229-33.
- [107] Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*. 2008;8:86.
- [108] Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Ennis FA. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Feb;48(2):222-9.

- [109] Perez AB, Garcia G, Sierra B, Alvarez M, Vazquez S, Cabrera MV, et al. IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *Journal of medical virology*. 2004 Jun;73(2):230-4.
- [110] Yeh WT, Chen RF, Wang L, Liu JW, Shaio MF, Yang KD. Implications of previous subclinical dengue infection but not virus load in dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 Oct;48(1):84-90.
- [111] Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*. 2001 Dec;204(4):494-507.
- [112] Suharti C, van Gorp EC, Dolmans WM, Setiati TE, Hack CE, Djokomoeljanto R, et al. Cytokine patterns during dengue shock syndrome. *Eur Cytokine Netw*. 2003 Jul-Sep;14(3):172-7.
- [113] Fink J, Gu F, Ling L, Tolfvenstam T, Olfat F, Chin KC, et al. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS neglected tropical diseases*. 2007;1(2):e86.
- [114] Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol*. 2006 Dec;87(Pt 12):3623-30.
- [115] Chen YC, Wang SY. 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*. 2002 Oct;76(19):9877-87.
- [116] Bosch I, Xhaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke RV, et al. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J Virol*. 2002 Jun;76(11):5588-97.
- [117] Carr JM, Hocking H, Bunting K, Wright PJ, Davidson A, Gamble J, et al. Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. *J Med Virol*. 2003 Apr;69(4):521-8.
- [118] Espina LM, Valero NJ, Hernandez JM, Mosquera JA. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor-alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Jan;68(1):48-53.
- [119] Neves-Souza PC. Infecção de monócitos humanos por DENV-2: expressão de TLR-2, óxido nítrico sintase e fator tecidual [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2005.
- [120] Reis SR, Sampaio AL, Henriques MG, Gandini M, Azeredo EL, Kubelka CF. An in vitro model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Dec;102(8):983-90.
- [121] Wati S, Li P, Burrell CJ, Carr JM. Dengue virus (DV) replication in monocyte-derived macrophages is not affected by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), and DV infection induces altered responsiveness to TNF-alpha stimulation. *J Virol*. 2007 Sep;81(18):10161-71.
- [122] Kwan WH, Navarro-Sanchez E, Dumortier H, Decossas M, Vachon H, Dos Santos FB, et al. Dermal-Type Macrophages Expressing CD209/DC-SIGN Show Inherent Resistance to Dengue Virus Growth. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008;2(10):e311.
- [123] Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol*. 1999 Nov;59(3):335-40.
- [124] Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000 Jul;28(3):183-8.
- [125] Libraty DH, Endy TP, Houg HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis*. 2002 May 1;185(9):1213-21.
- [126] Ho LJ, Shaio MF, Chang DM, Liao CL, Lai JH. Infection of human dendritic cells by dengue virus activates and primes T cells towards Th0-like phenotype producing both Th1 and Th2 cytokines. *Immunol Invest*. 2004;33(4):423-37.
- [127] Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol*. 2005 Sep;79(17):11053-61.

- [128] Sanchez V, Hessler C, DeMonfort A, Lang J, Guy B. Comparison by flow cytometry of immune changes induced in human monocyte-derived dendritic cells upon infection with dengue 2 live-attenuated vaccine or 16681 parental strain. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 Feb;46(1):113-23.
- [129] Sun P, Celluzzi CM, Marovich M, Subramanian H, Eller M, Widjaja S, et al. CD40 ligand enhances dengue viral infection of dendritic cells: a possible mechanism for T cell-mediated immunopathology. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):6497-503.
- [130] Sun P, Fernandez S, Marovich MA, Palmer DR, Celluzzi CM, Boonnak K, et al. Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. *Virology*. 2009 Jan 20;383(2):207-15.
- [131] Luplertlop N, Misse D, Bray D, Deleuze V, Gonzalez JP, Leardkamolkarn V, et al. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep*. 2006 Nov;7(11):1176-81.
- [132] Luplertlop N, Misse D. MMP cellular responses to dengue virus infection-induced vascular leakage. *Japanese journal of infectious diseases*. 2008 Jul;61(4):298-301.
- [133] Nightingale ZD, Patkar C, Rothman AL. Viral replication and paracrine effects result in distinct, functional responses of dendritic cells following infection with dengue 2 virus. *Journal of leukocyte biology*. 2008 Oct;84(4):1028-38.
- [134] Diamond MS, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol*. 2000 Jun;74(11):4957-66.
- [135] Foy E, Li K, Sumpter R, Jr., Loo YM, Johnson CL, Wang C, et al. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 22;102(8):2986-91.
- [136] Lin RJ, Liao CL, Lin E, Lin YL. Blocking of the alpha interferon-induced Jak-Stat signaling pathway by Japanese encephalitis virus infection. *J Virol*. 2004 Sep;78(17):9285-94.
- [137] Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, et al. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol*. 2005 May;79(9):5414-20.
- [138] Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, et al. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol*. 2005 Jun 15;174(12):8163-72.
- [139] Warke RV, Martin KJ, Giaya K, Shaw SK, Rothman AL, Bosch I. TRAIL is a novel antiviral protein against dengue virus. *J Virol*. 2008 Jan;82(1):555-64.
- [140] Tsai YT, Chang SY, Lee CN, Kao CL. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cellular microbiology*. 2008 Dec 24.
- [141] Wang JP, Liu P, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW, Libraty DH. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J Immunol*. 2006 Nov 15;177(10):7114-21.
- [142] Chang TH, Liao CL, Lin YL. Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF-kappaB activation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2006 Jan;8(1):157-71.
- [143] Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol*. 2008 Jan;82(1):335-45.
- [144] Green S, Pichyangkul S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Nisalak A, et al. Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1999 Nov;180(5):1429-35.
- [145] Pichyangkul S, Endy TP, Kalayanarooj S, Nisalak A, Yongvanitchit K, Green S, et al. A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. *J Immunol*. 2003 Nov 15;171(10):5571-8.
- [146] Kurane I, Hebblewaite D, Ennis FA. Characterization with monoclonal antibodies of human lymphocytes active in natural killing and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of dengue virus-infected cells. *Immunology*. 1986 Jul;58(3):429-36.
- [147] Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*. 2007 Jan;85(1):43-5.
- [148] Vasconcelos PF. [Yellow Fever]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 Mar-Apr;36(2):275-93.
- [149] Secretaria-de-Vigilância-em-Saúde. Situação da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2007 e 2008 E OUTROS

- BOLETIM DIARIO ENCERRADO AS 17h:00m DO DIA 30/01/2008. 2008.
- [150] Secretaria-de-Vigilância-em-Saúde. Tópicos de Saúde - Febre Amarela. 2006 [cited; Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21691
- [151] Secretaria-de-Vigilância-em-Saúde. Febre Amarela Silvestre, Rio Grande do Sul, 2008 e 2009. BOLETIM DIARIO ENCERRADO ÀS 17h DO DIA 04/02/2009. 2009.
- [152] O.M.S. Yellow Fever Fact Sheet nº100. 2001 [cited; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/print.html>
- [153] Barrett AD, Monath TP, Barban V, Niedrig M, Teuwen DE. 17D yellow fever vaccines: new insights. A report of a workshop held during the World Congress on medicine and health in the tropics, Marseille, France, Monday 12 September 2005. *Vaccine*. 2007 Apr 12;25(15):2758-65.
- [154] Monath TP. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res*. 2008 Apr;78(1):116-24.
- [155] Quaresma JA, Barros VL, Fernandes ER, Pagliari C, Takakura C, da Costa Vasconcelos PF, et al. Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. *Acta tropica*. 2005 May;94(2):116-27.
- [156] Quaresma JA, Barros VL, Fernandes ER, Pagliari C, Guedes F, da Costa Vasconcelos PF, et al. Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus Res*. 2006 Mar;116(1-2):91-7.
- [157] Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade HF, Jr., Vasconcelos PF, et al. Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007 Feb;101(2):161-8.
- [158] Quaresma JA, Duarte MI, Vasconcelos PF. Midzonal lesions in yellow fever: a specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ inflammatory response. *Medical hypotheses*. 2006;67(3):618-21.
- [159] ter Meulen J, Sakho M, Koulemou K, Magassouba N, Bah A, Preiser W, et al. Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. *J Infect Dis*. 2004 Nov 15;190(10):1821-7.
- [160] Marchevsky RS. Comportamento do vírus da Febre Amarela 17D no teste de neurotropismo e viscerotropismo em primatas não-humanos [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2001.
- [161] Lloyd W, Theiler M, Ricci NI. Modification of the virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1936;29:481-529.
- [162] Post PR, de Carvalho R, da Silva Freire M, Galler R. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Aug;96(6):849-57.
- [163] Barnett ED. Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 2007 Mar 15;44(6):850-6.
- [164] dos Santos CN, Post PR, Carvalho R, Ferreira, II, Rice CM, Galler R. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res*. 1995 Jan;35(1):35-41.
- [165] Engel AR, Vasconcelos PF, McArthur MA, Barrett AD. Characterization of a viscerotropic yellow fever vaccine variant from a patient in Brazil. *Vaccine*. 2006 Apr 5;24(15):2803-9.
- [166] Galler R, Pugachev KV, Santos CL, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, et al. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology*. 2001 Nov 25;290(2):309-19.
- [167] Rodrigues SG, da Rosa AP, Galler R, Barros VL, Vieira Cde M, da Rosa JF, et al. Yellow fever virus isolated from a fatal post vaccination event: an experimental comparative study with the 17DD vaccine strain in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37 Suppl 2:69-74.
- [168] Hayes EB. Acute viscerotropic disease following vaccination against yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007 Oct;101(10):967-71.
- [169] Struchiner CJ, Luz PM, Dourado I, Sato HK, Aguiar SG, Ribeiro JG, et al. Risk of fatal adverse events associated with 17DD yellow fever vaccine. *Epidemiology and infection*. 2004 Oct;132(5):939-46.
- [170] Bonaldo MC, Caufour PS, Freire MS, Galler R. The yellow fever 17D vaccine virus as a vector for the expression of foreign proteins: development of new live flavivirus vaccines. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95 Suppl 1:215-23.
- [171] Guirakhoo F, Zhang ZX, Chambers TJ, Delagrave S, Arroyo J, Barrett AD, et al. Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric yellow fever-

- Japanese encephalitis virus (ChimeriVax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis. *Virology*. 1999 May 10;257(2):363-72.
- [172] Monath TP, Guirakhoo F, Nichols R, Yoksan S, Schrader R, Murphy C, et al. Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen. *J Infect Dis*. 2003 Oct 15;188(8):1213-30.
- [173] Pugachev KV, Guirakhoo F, Mitchell F, Ocran SW, Parsons M, Johnson BW, et al. Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Nov;71(5):639-45.
- [174] Arroyo J, Miller C, Catalan J, Myers GA, Ratterree MS, Trent DW, et al. ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. *J Virol*. 2004 Nov;78(22):12497-507.
- [175] Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhang ZX, Soike K, Ratterree M, et al. Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol*. 2000 Jun;74(12):5477-85.
- [176] Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol*. 2001 Aug;75(16):7290-304.
- [177] Guirakhoo F, Kitchener S, Morrison D, Forrat R, McCarthy K, Nichols R, et al. Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. *Hum Vaccin*. 2006 Mar-Apr;2(2):60-7.
- [178] Guy B, Nougarede N, Begue S, Sanchez V, Souag N, Carre M, et al. Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine*. 2008 Oct 23;26(45):5712-21.
- [179] Caufour PS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira I, Jabor AV, et al. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Res*. 2001 Nov 5;79(1-2):1-14.
- [180] Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM, Jabor AV, et al. Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Dec;38(12):1835-46.
- [181] Mateu GP, Marchevsky RS, Liprandi F, Bonaldo MC, Coutinho ES, Dieudonne M, et al. Construction and biological properties of yellow fever 17D/dengue type 1 recombinant virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007 Mar;101(3):289-98.
- [182] Santos AP, Bertho AL, Dias DC, Santos JR, Marcovistz R. Lymphocyte subset analyses in healthy adults vaccinated with yellow fever 17DD virus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 May;100(3):331-7.
- [183] Martins RM, Galler R, Freire MS, Camacho LA, de Lourdes SMM, Homma A. Yellow fever vaccination: some thoughts on how much is enough [Vaccine 23 (2005) 3908-3914]. *Vaccine*. 2007 Jan 2;25(1):10-1.
- [184] Martins MA, Silva ML, Eloi-Santos SM, Ribeiro JG, Peruhype-Magalhaes V, Marciano AP, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine*. 2008 Feb 26;26(9):1173-84.
- [185] Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):116-25.
- [186] Brandler S, Brown N, Ermak TH, Mitchell F, Parsons M, Zhang Z, et al. Replication of chimeric yellow fever virus-dengue serotype 1-4 virus vaccine strains in dendritic and hepatic cells. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Jan;72(1):74-81.
- [187] Palmer DR, Fernandez S, Bisbing J, Peachman KK, Rao M, Barvir D, et al. Restricted replication and lysosomal trafficking of yellow fever 17D vaccine virus in human dendritic cells. *J Gen Virol*. 2007 Jan;88(Pt 1):148-56.
- [188] Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med*. 2006 Feb 20;203(2):413-24.

- [189] Deauvieu F, Sanchez V, Balas C, Kennel A, A DEM, Lang J, et al. Innate immune responses in human dendritic cells upon infection by chimeric yellow-fever dengue vaccine serotypes 1-4. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Jan;76(1):144-54.
- [190] Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-96.
- [191] Kelsall BL, Biron CA, Sharma O, Kaye PM. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat Immunol.* 2002 Aug;3(8):699-702.
- [192] Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood.* 2001 Jun 1;97(11):3333-41.
- [193] Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *Apmis.* 2003 Jul-Aug;111(7-8):675-97.
- [194] Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):97-130.
- [195] Klechevsky E, Kato H, Sponaas AM. Dendritic cells star in Vancouver. *J Exp Med.* 2005 Jul 4;202(1):5-10.
- [196] Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jan;7(1):19-30.
- [197] Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* 2005 Jul;23(1):19-28.
- [198] Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):351-8.
- [199] Sabatte J, Maggini J, Nahmod K, Amaral MM, Martinez D, Salamone G, et al. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Feb-Apr;18(1-2):5-17.
- [200] Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997 Feb;9(1):10-6.
- [201] Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
- [202] van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):697-709.
- [203] Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol.* 2008 Feb;20(1):17-22.
- [204] Wallet MA, Sen P, Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res.* 2005 Aug;3(3):166-75.
- [205] Norbury CC. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology.* 2006 Apr;117(4):443-51.
- [206] Quah BJ, O'Neill HC. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J Cell Mol Med.* 2005 Jul-Sep;9(3):643-54.
- [207] Steinman RM. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell.* 2000 Mar 3;100(5):491-4.
- [208] MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med.* 2003 Aug 18;198(4):615-21.
- [209] Partida-Sanchez S, Goodrich S, Kusser K, Oppenheimer N, Randall TD, Lund FE. Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity.* 2004 Mar;20(3):279-91.
- [210] Frasca L, Fedele G, Deaglio S, Capuano C, Palazzo R, Vaisitti T, et al. CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells. *Blood.* 2006 Mar 15;107(6):2392-9.
- [211] Reis ESC. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006 Jun;6(6):476-83.
- [212] Lanzavecchia A, Sallusto F. Lead and follow: the dance of the dendritic cell and T cell. *Nat Immunol.* 2004 Dec;5(12):1201-2.
- [213] Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahashi Y, Maliszewski C, Delespesse G. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol.* 1997 Oct 15;159(8):3838-48.
- [214] Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, et al. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood.* 1998 Nov 1;92(9):3338-45.

- [215] Delespesse G, Ohshima Y, Yang LP, Demeure C, Sarfati M. OX40-Mediated cosignal enhances the maturation of naive human CD4⁺ T cells into high IL-4-producing effectors. *International archives of allergy and immunology*. 1999 Feb-Apr;118(2-4):384-6.
- [216] Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med*. 2005 Nov 7;202(9):1213-23.
- [217] Jenkins SJ, Perona-Wright G, Worsley AG, Ishii N, MacDonald AS. Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo. *J Immunol*. 2007 Sep 15;179(6):3515-23.
- [218] Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2007 Mar;7(3):179-90.
- [219] Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*. 2006 Feb;7(2):131-7.
- [220] Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:55-72.
- [221] Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, et al. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol*. 2003 Nov 15;171(10):4984-9.
- [222] Yi AK, Yoon JG, Yeo SJ, Hong SC, English BK, Krieg AM. Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response. *J Immunol*. 2002 May 1;168(9):4711-20.
- [223] Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:411-52.
- [224] Cerami A. Tumor necrosis factor as a mediator of shock, cachexia and inflammation. *Blood Purif*. 1993;11(2):108-17.
- [225] Sundgren-Andersson AK, Ostlund P, Bartfai T. IL-6 is essential in TNF-alpha-induced fever. *The American journal of physiology*. 1998 Dec;275(6 Pt 2):R2028-34.
- [226] Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:331-67.
- [227] Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005 May;115(1):1-20.
- [228] Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Jun-Aug;14(3-4):185-91.
- [229] Song M, Kellum JA. Interleukin-6. *Crit Care Med*. 2005 Dec;33(12 Suppl):S463-5.
- [230] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32.
- [231] Katze MG, He Y, Gale M, Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol*. 2002 Sep;2(9):675-87.
- [232] Marshall JD, Heeke DS, Abbate C, Yee P, Van Nest G. Induction of interferon-gamma from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon-alpha and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology*. 2006 Jan;117(1):38-46.
- [233] Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Feb;19(1):41-52.
- [234] Lamacchia C, Palmer G, Benoit A, Talabot D, Gabay C. 68 Biological role of myeloid cell-derived interleukin-1 receptor antagonist in collagen-induced arthritis. In: *Cytokine*, editor. 7th Joint Conference of the International Cytokine Society and the International Society for Interferon and Cytokine Research, CYTOKINES IN CANCER, INFLAMMATION AND INFECTIOUS DISEASES: TRANSLATING SCIENCE INTO HEALTH 2008 September 2008; 2008. p. 252.
- [235] O'Garra A, Trinchieri G. Are dendritic cells afraid of commitment? *Nat Immunol*. 2004 Dec;5(12):1206-8.
- [236] Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 2003 May;18(5):605-17.

- [237] Scumpia PO, Moldawer LL. Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med.* 2005 Dec;33(12 Suppl):S468-71.
- [238] Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *The Journal of investigative dermatology.* 2005 Oct;125(4):615-28.
- [239] Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):102-7.
- [240] Thomsen AR, Nansen A, Madsen AN, Bartholdy C, Christensen JP. Regulation of T cell migration during viral infection: role of adhesion molecules and chemokines. *Immunology letters.* 2003 Jan 22;85(2):119-27.
- [241] Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, et al. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol.* 2000 Jul;1(1):83-7.
- [242] Zou W, Borvak J, Marches F, Wei S, Galanaud P, Emilie D, et al. Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by beta-chemokines rather than IL-12. *J Immunol.* 2000 Oct 15;165(8):4388-96.
- [243] Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* 2003 Dec;3(12):984-93.
- [244] Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, Kunkel SL. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J Immunol.* 1996 Nov 15;157(10):4602-8.
- [245] Matsukawa A, Lukacs NW, Standiford TJ, Chensue SW, Kunkel SL. Adenoviral-mediated overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 differentially alters the development of Th1 and Th2 type responses in vivo. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1699-704.
- [246] Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity.* 1999 Dec;11(6):753-61.
- [247] Kaiserlian D, Dubois B. Dendritic cells and viral immunity: friends or foes? *Semin Immunol.* 2001 Oct;13(5):303-10.
- [248] Raftery MJ, Kraus AA, Ulrich R, Kruger DH, Schonrich G. Hantavirus infection of dendritic cells. *J Virol.* 2002 Nov;76(21):10724-33.
- [249] Krakauer T, Leduc JW, Krakauer H. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interleukin-6 in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Viral Immunol.* 1995;8(2):75-9.
- [250] Linderholm M, Ahlm C, Settergren B, Waage A, Tarnvik A. Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis.* 1996 Jan;173(1):38-43.
- [251] Mori M, Rothman AL, Kurane I, Montoya JM, Nolte KB, Norman JE, et al. High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis.* 1999 Feb;179(2):295-302.
- [252] Bray M, Geisbert TW. Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Aug;37(8):1560-6.
- [253] Bosio CM, Aman MJ, Grogan C, Hogan R, Ruthel G, Negley D, et al. Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation. *J Infect Dis.* 2003 Dec 1;188(11):1630-8.
- [254] Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *Apmis.* 2003 Jul-Aug;111(7-8):698-714.
- [255] Ludwig IS, Lekkerkerker AN, Depla E, Bosman F, Musters RJ, Depraetere S, et al. Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation. *J Virol.* 2004 Aug;78(15):8322-32.
- [256] van Kooyk Y, Appelmelk B, Geijtenbeek TB. A fatal attraction: Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends Mol Med.* 2003 Apr;9(4):153-9.
- [257] Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, Kao CL, Chang DM, Han SW, et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol.* 2001 Feb 1;166(3):1499-506.
- [258] Palmer DR, Sun P, Celluzzi C, Bisbing J, Pang S, Sun W, et al. Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. *J Virol.* 2005 Feb;79(4):2432-9.

- [259] Halstead SB, Marchette NJ. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Dec;69(6 Suppl):5-11.
- [260] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938;27:493-7.
- [261] Kittigul L, Temprom W, Sujirarat D, Kittigul C. Determination of tumor necrosis factor-alpha levels in dengue virus infected patients by sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods.* 2000 Oct;90(1):51-7.
- [262] Cesbron-Gautier A, Simon P, Achard L, Cury S, Follea G, Bignon JD. [Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2004 Jan-Feb;62(1):93-8.
- [263] Heijmans-Antonissen C, Wesseldijk F, Munnikes RJ, Huygen FJ, van der Meijden P, Hop WC, et al. Multiplex bead array assay for detection of 25 soluble cytokines in blister fluid of patients with complex regional pain syndrome type 1. *Mediators Inflamm.* 2006;2006(1):28398.
- [264] Dupont NC, Wang K, Wadhwa PD, Culhane JF, Nelson EL. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *J Reprod Immunol.* 2005 Aug;66(2):175-91.
- [265] Reis SR, Valente LM, Sampaio AL, Siani AC, Gandini M, Azeredo EL, et al. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *Int Immunopharmacol.* 2008 Mar;8(3):468-76.
- [266] Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, et al. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods.* 2004 May;288(1-2):123-34.
- [267] Grassi F, Dezutter-Dambuyant C, McIlroy D, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, et al. Monocyte-derived dendritic cells have a phenotype comparable to that of dermal dendritic cells and display ultrastructural granules distinct from Birbeck granules. *J Leukoc Biol.* 1998 Oct;64(4):484-93.
- [268] Kasinrerk W, Baumruker T, Majdic O, Knapp W, Stockinger H. CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 1993 Jan 15;150(2):579-84.
- [269] Granelli-Piperno A, Pritsker A, Pack M, Shimeliovich I, Arrighi JF, Park CG, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol.* 2005 Oct 1;175(7):4265-73.
- [270] Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994 Jul 1;180(1):83-93.
- [271] Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol.* 1999 Jul;60(7):562-7.
- [272] Lambeth CR, White LJ, Johnston RE, de Silva AM. Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3267-72.
- [273] Dejnirattisai W, Duangchinda T, Lin CL, Vasanawathana S, Jones M, Jacobs M, et al. A complex interplay among virus, dendritic cells, T cells, and cytokines in dengue virus infections. *J Immunol.* 2008 Nov 1;181(9):5865-74.
- [274] Zilber MT, Gregory S, Mallone R, Deaglio S, Malavasi F, Charron D, et al. CD38 expressed on human monocytes: a coaccessory molecule in the superantigen-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2840-5.
- [275] Fedele G, Frasca L, Palazzo R, Ferrero E, Malavasi F, Ausiello CM. CD38 is expressed on human mature monocyte-derived dendritic cells and is functionally involved in CD83 expression and IL-12 induction. *European journal of immunology.* 2004 May;34(5):1342-50.
- [276] Le Nouen C, Munir S, Losq S, Winter CC, McCarty T, Stephany DA, et al. Infection and maturation of monocyte-derived human dendritic cells by human respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and human parainfluenza virus type 3. *Virology.* 2009 Jan 5.
- [277] Blazquez AB, Berin MC. Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L. *J Immunol.* 2008 Apr 1;180(7):4441-50.
- [278] Overton WR. Modified histogram subtraction technique for analysis of flow cytometry data. *Cytometry.* 1988 Nov;9(6):619-26.

- [279] Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *The New England journal of medicine*. 1996 Jun 27;334(26):1717-25.
- [280] Lorente JA, Marshall JC. Neutralization of tumor necrosis factor in preclinical models of sepsis. *Shock* (Augusta, Ga. 2005 Dec;24 Suppl 1:107-19.
- [281] Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007 Jun-Aug;18(3-4):335-43.
- [282] Waage A, Halstensen A, Espevik T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet*. 1987 Feb 14;1(8529):355-7.
- [283] Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*. 1990 Nov 17;336(8725):1201-4.
- [284] Vilcek J, Feldmann M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends in pharmacological sciences*. 2004 Apr;25(4):201-9.
- [285] Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol*. 2007 Jun;81(11):5518-26.
- [286] Hacker UT, Jelinek T, Erhardt S, Eigler A, Hartmann G, Nothdurft HD, et al. In vivo synthesis of tumor necrosis factor-alpha in healthy humans after live yellow fever vaccination. *J Infect Dis*. 1998 Mar;177(3):774-8.
- [287] Ahmad SM, Haskell MJ, Raqib R, Stephensen CB. Men with low vitamin A stores respond adequately to primary yellow fever and secondary tetanus toxoid vaccination. *The Journal of nutrition*. 2008 Nov;138(11):2276-83.
- [288] Tovey MG, Lallemand C, Thyphronitis G. Adjuvant activity of type I interferons. *Biological chemistry*. 2008 May;389(5):541-5.
- [289] Parlato S, Santini SM, Lapenta C, Di Pucchio T, Logozzi M, Spada M, et al. Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood*. 2001 Nov 15;98(10):3022-9.
- [290] Taniguchi T, Takaoka A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol*. 2002 Feb;14(1):111-6.
- [291] Tailor P, Tamura T, Ozato K. IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. *Cell Res*. 2006 Feb;16(2):134-40.
- [292] Suhrbier A, La Linn M. Suppression of antiviral responses by antibody-dependent enhancement of macrophage infection. *Trends Immunol*. 2003 Apr;24(4):165-8.
- [293] Schul W, Liu W, Xu HY, Flamand M, Vasudevan SG. A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs. *J Infect Dis*. 2007 Mar 1;195(5):665-74.
- [294] Wesa A, Galy A. Increased production of pro-inflammatory cytokines and enhanced T cell responses after activation of human dendritic cells with IL-1 and CD40 ligand. *BMC immunology*. 2002 Oct 18;3:14.
- [295] Lore K, Sonnerborg A, Olsson J, Patterson BK, Fehniger TE, Perbeck L, et al. HIV-1 exposed dendritic cells show increased pro-inflammatory cytokine production but reduced IL-1ra following lipopolysaccharide stimulation. *AIDS (London, England)*. 1999 Oct 22;13(15):2013-21.
- [296] Hacker UT, Erhardt S, Tschop K, Jelinek T, Endres S. Influence of the IL-1Ra gene polymorphism on in vivo synthesis of IL-1Ra and IL-1beta after live yellow fever vaccination. *Clin Exp Immunol*. 2001 Sep;125(3):465-9.
- [297] Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:205-18.
- [298] Bae HG, Domingo C, Tenorio A, de Ory F, Munoz J, Weber P, et al. Immune response during adverse events after 17D-derived yellow fever vaccination in Europe. *J Infect Dis*. 2008 Jun 1;197(11):1577-84.
- [299] Pulendran B, Miller J, Querec TD, Akondy R, Moseley N, Laur O, et al. Case of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15;198(4):500-7.

- [300] Rabablert J, Wasi C, Kinney R, Kasisith J, Pitidhamabhorn D, Ubol S. Attenuating characteristics of DEN-2 PDK53 in flavivirus-naive peripheral blood mononuclear cells. *Vaccine*. 2007 May 10;25(19):3896-905.
- [301] Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiao AL, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol*. 2005 Jan 1;174(1):395-403.
- [302] King CA, Anderson R, Marshall JS. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. *J Virol*. 2002 Aug;76(16):8408-19.
- [303] Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol*. 1998 Dec 1;161(11):6338-46.
- [304] Khaiboullina SF, Rizvanov AA, Holbrook MR, St Jeor S. Yellow fever virus strains Asibi and 17D-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression. *Virology*. 2005 Nov 25;342(2):167-76.
- [305] Hsieh MF, Lai SL, Chen JP, Sung JM, Lin YL, Wu-Hsieh BA, et al. Both CXCR3 and CXCL10/IFN-inducible protein 10 are required for resistance to primary infection by dengue virus. *J Immunol*. 2006 Aug 1;177(3):1855-63.
- [306] Chen JP, Lu HL, Lai SL, Campanella GS, Sung JM, Lu MY, et al. Dengue virus induces expression of CXC chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate. *J Immunol*. 2006 Sep 1;177(5):3185-92.

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](#)